

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Ensayos de degradación *in vitro* del ADN de
Escherichia coli frente al extracto hidroalcohólico
y zumo de *Origanum vulgare* L. "orégano".
Ayacucho 2019.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA, EN LA ESPECIALIDAD DE MICROBIOLOGÍA**

Presentado por la:
Bach. LAGOS HUACHACA, Judith

AYACUCHO – PERÚ
2020

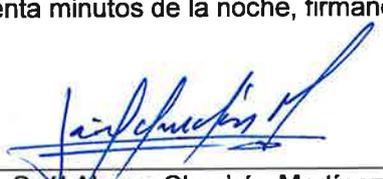
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Bach. Judith LAGOS HUACHACA
R.D. N°. 075-2020-UNSCH-FCB-D

A los treinta días del mes de octubre del año dos mil veinte, siendo las cinco de la tarde, se reunieron a través de la plataforma virtual Google Meet, los docentes miembros del jurado calificador conformado por: Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez (presidente); Gilmar Peña Rojas (miembro jurado); Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich (miembro asesor), Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua (miembro 4to jurado), actuando como secretaria docente la Mg. Nilda Aurea Apayco Espinoza, para recepcionar la sustentación de tesis titulada: **“Ensayos de degradación in vitro del ADN de *Escherichia coli* frente al extracto hidroalcohólico y zumo de *Origanum vulgare* L. “orégano”. Ayacucho, 2019;”**, presentada por la Bach. **Judith LAGOS HUACHACA**; previa verificación de la documentación exigida, el presidente autorizó el inicio del acto académico precisando que la sustentante dispone de cuarenticinco minutos, conforme lo establece el reglamento de grados y títulos de la Facultad de Ciencias Biológicas. Finalizada la sustentación, el presidente invitó a los miembros del jurado a participar con observaciones, aclaraciones y preguntas relacionadas al tema; el asesor se comprometió cumplir con las correcciones y sugerencias realizadas. Concluida esta etapa, el presidente invitó al sustentante y a los asistentes abandonar la sala virtual a fin de proceder a la deliberación y calificación correspondiente.

Seguidamente procedieron a la calificación, alcanzando los siguientes resultados:

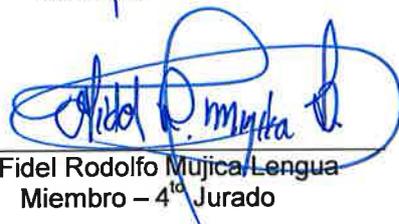
MIEMBROS DEL JURADO EVALUADOR	EXPOSICIÓN	RESPUESTA A PREGUNTAS	PROMEDIO
Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez			
Dr. Gilmar Peña Rojas	18	16	17
Blgo. Tomas Y. Miranda Tomasevich	17	17	17
Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua	16	16	16
		PROMEDIO	17

La sustentante alcanzó el promedio de 17 (diecisiete) aprobatorio. Acto seguido, el presidente invitó a la sustentante y público reingresar a la sala virtual para dar a conocer el resultado de la evaluación; finalizando el presente acto académico siendo las ocho con cuarenta minutos de la noche, firmando al pie del presente en señal de conformidad.


Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez
Presidente


Dr. Gilmar Peña Rojas
Miembro – Jurado


Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich
Miembro - Asesor


Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua
Miembro – 4^{to} Jurado


Mg. Nilda Aurea Apayco Espinoza
Secretario - Docente



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

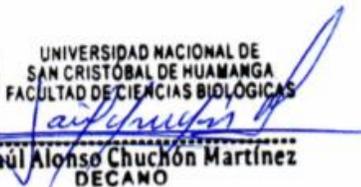
DECANATURA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS N° 004-
2021-FCB-D

Yo, SAÚL ALONSO CHUCHÓN MARTÍNEZ, Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional De San Cristóbal De Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **“Ensayos de degradación in vitro del ADN de Escherichia coli frente al extracto hidroalcohólico y zumo de Origanum vulgare L. “orégano”. Ayacucho 2019”**, presentado por la Bach. JUDITH LAGOS HUACHACA; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 20%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario N° 039-2021-UNSCH-C.

En tal sentido, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 17 de junio del 2021.


UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez
DECANO

Ensayos de degradación in vitro del ADN de Escherichia coli frente al extracto hidroalcohólico y zumo de Origanum vulgare L. “orégano”.

Ayacucho 2019.

por Judith Lagos Huachaca

Fecha de entrega: 17-jun-2021 07:41a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 1608008882

Nombre del archivo: 1A_LAGOS_HUACHACA_JUDITH_PREGADO_2021_TURNITIN.docx..docx (1.98M)

Total de palabras: 14372

Total de caracteres: 76597

Ensayos de degradación in vitro del ADN de Escherichia coli frente al extracto hidroalcohólico y zumo de Origanum vulgare L. "orégano". Ayacucho 2019.

INFORME DE ORIGINALIDAD

20%

INDICE DE SIMILITUD

20%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	11%
2	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	4%
3	idoc.pub Fuente de Internet	1%
4	repositorio.unsaac.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	Submitted to Oxford Brookes University Trabajo del estudiante	1%
6	es.slideshare.net Fuente de Internet	<1%
7	rpmesp.ins.gob.pe Fuente de Internet	<1%
8	repository.javeriana.edu.co Fuente de Internet	<1%

9

www.doccity.com

Fuente de Internet

<1%

10

maferib.blogspot.com

Fuente de Internet

<1%

11

www.burrosabio.com

Fuente de Internet

<1%

12

doczz.es

Fuente de Internet

<1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

< 30 words

Excluir bibliografía

Activo

Al cerrar este capítulo en mi vida, el cual considero uno de los más importantes, ya que con él se me abrirán nuevas oportunidades dedico este trabajo a todos los que de una u otra manera han colaborado en la realización de este sueño.

A Dios por darme la oportunidad, el entusiasmo y la fortaleza de culminar mis estudios brindándome salud.

A mis padres Francisca y Lucio por ser ejemplo de perseverancia, humildad y sacrificio.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a nuestra *Alma Mater* a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, que me acogió durante éstos años de estudio y me dio la oportunidad de adquirir conocimientos, forjadora de excelentes profesionales al servicio de la comunidad Ayacuchana, dentro y fuera del país.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, a la Escuela Profesional de Biología, así mismo, a todos los docentes que me brindaron sus conocimientos y experiencias en el transcurso de mi vida estudiantil.

A mi asesor Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich y de igual manera a mi Co-asesora Mg. Miriam Moreno Hinojosa por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico.

A mis padres, hermanas y a todas las personas especiales por su apoyo incondicional y confianza brindada en todo momento, a mis amigos que siempre estuvieron conmigo apoyándome en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO Teórico	3
2.1. Antecedentes del estudio	3
2.2. Bases teóricas	8
2.2.1. <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano”	8
2.2.2. <i>Escherichia coli</i>	11
2.2.3. Factores que afectan la estabilidad del ADN	16
2.2.4. Efecto de los metabolitos secundarios sobre el ADN	17
2.2.5. Genotoxicidad	18
2.2.6. Ensayo de exposición directa del ADN bacteriano a extractos vegetales	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Lugar de ejecución	21
3.2. Definición de la población y muestra	21
3.2.1. Población	21
3.2.2. Muestra	21
3.2.3. Muestreo	21
3.3. Unidad experimental	22
3.4. Metodología	22
3.4.1. Recolección de plantas de orégano	22
3.4.2. Obtención del polvo de orégano	22
3.4.3. Obtención del extracto hidroalcohólico y zumo de orégano	22
3.4.4. Análisis fitoquímico	23
3.5. Cultivo de <i>Escherichia coli</i> y extracción de ADN genómico	23
3.6. Evaluación del ADN extraído	23
3.6.1. Determinación de la concentración por espectrofotometría	25
3.6.2. Evaluación de la calidad del ADN extraído por electroforesis	25
3.7. Ensayo de degradación in vitro	26

3.7.1. Preparación del stock de ADN genómico	26
3.7.2. Ensayos de degradación in vitro del ADN genómico bacteriano frente al extracto hidroalcohólico y zumo de orégano	26
3.7.3. Electroforesis en gel de agarosa	27
3.7.4. Fotodocumentación	28
3.7.5. Interpretación visual y clasificación de la degradación in vitro del ADN en términos de fragmentación frente al extracto o zumo de la planta, plasmado en el registro fotográfico	30
3.8. Tipo de investigación	30
3.9. Diseño de investigación	30
3.10. Análisis de datos estadísticos	31
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSIÓN	45
VI. CONCLUSIONES	53
VII. RECOMENDACIONES	55
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	61

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características producidas en los ensayos para la identificación de los metabolitos secundarios de plantas.	25
Tabla 2. Preparación de carga de ADN para visualización de banda en electroforesis.	26
Tabla 3. Preparación de las mezclas para el primer ensayo de degradación <i>in vitro</i> del ADN genómico de <i>Escherichia coli</i> frente a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de orégano.	27
Tabla 4. Preparación de las mezclas para el segundo ensayo de degradación <i>in vitro</i> del ADN genómico de <i>Escherichia coli</i> frente a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de orégano.	28
Tabla 5. Preparación de las mezclas para ensayo de degradación <i>in vitro</i> de ADN genómico de <i>Escherichia coli</i> frente a diferentes concentraciones de zumo de orégano.	28
Tabla 6. Preparación de mezclas para electroforesis correspondientes al primer ensayo de degradación <i>in vitro</i> con extracto hidroalcohólico de orégano.	29
Tabla 7. Preparación de mezclas para electroforesis correspondientes al segundo ensayo de degradación <i>in vitro</i> con extracto hidroalcohólico de orégano.	29
Tabla 8. Preparación de mezclas para electroforesis para el ensayo de degradación <i>in vitro</i> con zumo de orégano	29
Tabla 9. Clasificación visual de la degradación <i>in vitro</i> del ADN, en términos de niveles de su fragmentación (valores numéricos), observados en registro fotográfico.	30
Tabla 10. Diseño de investigación con pos prueba únicamente y grupo de control.	31
Tabla 11. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano". Ayacucho, 2019.	35
Tabla 12. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el zumo de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano". Ayacucho, 2019.	36

- Tabla 13. Valores numéricos de cuatro ensayos de degradación *in vitro* del ADN genómico de *Escherichia coli*, expresado en su fragmentación, frente al extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* L. “orégano” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, incubados a 37°C durante 1h. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019. 41
- Tabla 14. Valores numéricos de cuatro ensayos de degradación *in vitro* del ADN genómico de *Escherichia coli*, expresado en su fragmentación, frente al zumo de de *Origanum vulgare* L. “orégano” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100%, incubados a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019. 42

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Parcela de terreno con plantas de orégano.	9
Figura 2. Formación del nucleoide de <i>Escherichia coli</i> .	13
Figura 3. Mapa de ubicación de la localidad de Muyurina, lugar del muestreo.	22
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN genómico de <i>E. coli</i> . Corrida a 30V x 60 min. Carriles (1-9).	37
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico de <i>E. coli</i> frente al extracto hidroalcohólico de orégano. Corrida a 40V x 150 min. Carril (M), marcador de tamaño molecular de 1 kb; carriles (1-5), extracto hidroalcohólico de orégano a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente; Carril (6), testigo de extracto hidroalcohólico puro de orégano (100 mg/MI); Carril (7), control ADN de <i>E. coli</i> . Carril (8), extracto hidroalcohólico puro + Proteinasa K + ADN de <i>E. coli</i> .	38
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico de <i>E. coli</i> frente al extracto hidroalcohólico de orégano. Corrida a 40V x 150 min. Carril (M), marcador de tamaño molecular de 1 kb; carriles (1-6), extracto hidroalcohólico de orégano a concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente; Carril (7), testigo de extracto hidroalcohólico puro de orégano (500 mg/mL); Carril (8), control ADN de <i>E. coli</i> ; Carril (9), extracto hidroalcohólico puro + Proteinasa K + ADN de <i>E. coli</i> .	39
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico de <i>E. coli</i> frente al zumo de orégano. Corrida a 40V x 150 min. Carril (M), marcador de tamaño molecular de 1 kb; carriles (1-5), zumo de orégano a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 %, respectivamente; Carril (6), testigo de zumo puro de orégano (100 %); Carril (7), control ADN de <i>E. coli</i> ; Carril (8), zumo puro + Proteinasa K + ADN de <i>E. coli</i> .	40
Figura 8. Grado de degradación <i>in vitro</i> del ADN genómico de <i>Escherichia coli</i> expresado en su fragmentación, frente al	43

extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* L. “orégano” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, incubados a 37°C durante 1h. Prueba de Kruskal-Wallis (H=27,0; GL=6, P=0,000); CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.

Figura 9. Grado de degradación *in vitro* del ADN genómico de *Escherichia coli*, expresado en su fragmentación, frente al zumo de *Origanum vulgare* L. “orégano” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100 %, incubados a 37°C durante una hora. Prueba de Kruskal-Wallis (H=27,0; GL=6, P=0,000); CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019. 44

ÍNDICE DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1.	Constancia de identificación botánica de <i>Origanum vulgare</i> “orégano”. Ayacucho 2018.	63
Anexo 2.	Acta de entrega de la Cepa de <i>Escherichia coli</i> . Ayacucho 2019.	64
Anexo 3.	Parcela y secado a temperatura ambiente de las hojas y tallos de <i>Origanum vulgare</i> L “orégano”. Ayacucho, 2019.	65
Anexo 4.	Obtención de molienda y extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos secos de <i>Origanum vulgare</i> L “orégano”. Ayacucho, 2019.	66
Anexo 5.	Obtención del zumo del <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano”. Ayacucho 2019.	67
Anexo 6.	Flujograma para la obtención del extracto hidroalcohólico del <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano”. Ayacucho 2019.	68
Anexo 7.	Flujograma para la obtención del zumo de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano”. Ayacucho 2019.	69
Anexo 8.	Diagrama para la identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico y del zumo de “orégano”. Ayacucho 2019.	70
Anexo 9.	Proceso de cultivo de <i>Escherichia coli</i> . Ayacucho 2019.	71
Anexo 10.	Proceso de extracción de ADN genómico de <i>Escherichia coli</i> Ayacucho 2019.	72
Anexo 11.	Proceso de electroforesis del ADN de <i>Escherichia coli</i> . Ayacucho 2019.	73
Anexo 12.	Proceso de preparación a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de “orégano”. Ayacucho 2019.	74
Anexo 13.	Proceso de preparación a diferentes concentraciones del zumo de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano”. Ayacucho 2019.	75
Anexo 14.	Electroforesis en gel de agarosa .Ayacucho 2019.	76
Anexo 15.	Proceso de sembrado en los pocillos del gel de agarosa de la digestión con extracto hidroalcohólico y zumo de orégano y ADN genómico de <i>Escherichia coli</i> . Ayacucho 2019.	77
Anexo 16.	Matriz de consistencia.	78

RESUMEN

Recientemente se viene presentando gran interés por las plantas medicinales en búsqueda de nuevas propiedades bioactivas por sus bondades terapéuticas que presenta diversas plantas. Para el presente trabajo de investigación se planteó como objetivo demostrar la degradación *in vitro* del ADN de *Escherichia coli* frente al extracto hidroalcohólico y zumo de *Origanum vulgare* L. "orégano". El estudio se realizó entre los meses de febrero a octubre del 2019 en el Centro de Investigación de Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas y en el laboratorio de Farmacognosia de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho-Perú. El extracto hidroalcohólico etanol: agua (3:1) se obtuvo luego de la maceración de la molienda de hojas y tallos secos de *Origanum vulgare* L. "orégano", durante 5 días; mientras que el zumo se obtuvo directamente de hojas y tallos frescos; se realizaron los tamizajes fitoquímicos del extracto hidroalcohólico y del zumo, respectivamente; luego los ensayos de degradación *in vitro* del ADN genómico de *Escherichia coli* frente al extracto hidroalcohólico fueron a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500mg/mL, mientras que, con el zumo fueron a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100%, la estimación del daño al ADN *in vitro* fue determinado con el método Tomasevich, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio al 1% y visualizado en radiación de luz ultra violeta en el registrador de imágenes Biometra UVsolo TS®. Los metabolitos secundarios identificados en el extracto hidroalcohólico del orégano fueron: fenoles y/o taninos, flavonoides y catequinas en concentraciones abundantes, lactonas y/o cumarinas en regular concentración y alcaloides en trazas; mientras que, en el zumo se detectó la presencia de fenoles y/o taninos en concentración abundante, flavonoides y alcaloides en regular concentración. Los mayores daños de degradación *in vitro* del ADN genómico de *Escherichia coli*. Frente al extracto hidroalcohólico se manifestaron a concentraciones de 500, 400 y 300 mg/ml, en tanto que, con el zumo fueron a 100, 50 y 25 %; la prueba de Kruskal-Wallis establece que el daño del ADN es directamente proporcional a la concentración del extracto hidroalcohólico y zumo del orégano. Se concluye que el extracto hidroalcohólico y el zumo de orégano, genera degradación *in vitro* en el ADN genómico de *Escherichia coli*.

Palabras clave: Daño genómico, *Origanum vulgare*, orégano

I. INTRODUCCIÓN

Cerca de un 25% del total de prescripciones médicas en los países avanzados e industrializados se tratan con plantas medicinales^{1,2}, mientras que, en los países en desarrollo, como también menciona la OMS, que un total de 80% de la población del mundo, viven exclusivamente con hierbas para sus cuidados en su salud³. Las plantas medicinales, representan fuentes importantes de nuevas identidades moleculares, principalmente debido el hecho de que pueden sintetizar y producir componentes que son difíciles de obtener a través de síntesis química⁴. Dichos compuestos obtenidos de fuentes naturales pueden servir como prototipos para la síntesis de nuevos fármacos con actividades biológicas y terapéuticas o pueden modificarse ligeramente para hacerlos más efectivos o menos tóxicos⁵. El “orégano” *Origanum vulgare* L., una de las plantas muy utilizadas de manera culinaria en diferentes comidas y con fines medicinales⁶. Dichas plantas contienen numerosos compuestos biológicamente activos y tienen propiedades farmacológicas comprobadas, muchos estudios están demostrando a la vez que pueden ocasionar toxicidad que depende principalmente de la dosis consumida⁷. Al desconocerse los daños que podrían estar provocando, como la genotoxicidad y citotoxicidad a causa del impacto de los compuestos químicos sintetizados por las plantas, entre ellos aquel que puede provocar lesiones a nivel del DNA de las células del organismo especialmente aquellos que están en relación de manera directa con estas plantas o con sus extractos, consigue mucha trascendencia por la alta correlación existente entre el mal al ADN y las patologías hereditarias⁸. Por esto la labor importante es conocer si estas tienen la posibilidad de estar ejerciendo impacto al ADN y conocer el valor de las concentraciones que puede estar provocando el daño, por ello resulta indispensable la evaluación de la genotoxicidad.⁷ Si bien se sabe que la toxicidad de los medicamentos a base de hierbas aún no está evaluada completamente en la mayoría de los casos,

podimos corroborar que pueden ser extremadamente dañinas para la salud humana, como estudios lo demuestran, que algunas plantas son potencialmente genotóxico⁹. Datos revelan que en los últimos 30 años, diferentes metodologías, estrategias se han venido desarrollado para evaluar los efectos genotóxicos¹⁰. Estos ensayos de genotoxicidad se utilizan normalmente para identificar extractos, sustancias que tienen la capacidad de interactuar con ácidos nucleicos en bajas o altas concentraciones, dicha interacción puede conducir aberraciones o cambios cromosómicos en la estructura del ADN que puede afectar la fidelidad del mensaje y conducir a cambios irreversibles en la célula y ser una predisposición a enfermedades¹¹.

El objetivo de nuestra investigación estuvo orientado a indagar la degradación *in vitro* del ADN de la bacteria, por impacto del extracto hidroalcohólico, como del zumo de "*Origanum vulgare*", se obtuvo información de la actividad que desempeña sobre el ADN de la bacteria, cuya estimación de degradación *in vitro* ha sido definido por el método Tomasevich, el cual se basa en enfrentar al ADN genómico bacteriano a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico y zumo de orégano, después se procedió éste producto a la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1% y bromuro de etidio al 1% para después visualizarlo en radiación de luz UV e interpretar el impacto provocado en la composición del ADN, por consiguiente, constituye un procedimiento eficiente para demostrar la genotoxicidad de los extractos de las plantas medicinales. Por otro lado realizamos la marcha fitoquímica para ver la existencia de diferentes metabolitos secundarios presentes en el orégano. Para el estudio se planteó los siguientes objetivos:

Objetivo principal

Demostrar la degradación *in vitro* del ADN de *Escherichia coli* frente al extracto hidroalcohólico y zumo de *Origanum vulgare* L. "orégano"

Objetivos específicos

1. Detectar la existencia de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico y zumo de *Origanum vulgare* L. "orégano".
2. Comprobar la degradación *in vitro* del ADN genómico de *Escherichia coli*, expresado en su fragmentación, frente al extracto hidroalcohólico y zumo de *Origanum vulgare* L. "orégano".

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

Realizaron estudios de diferentes especies de orégano originarios del continente europeo y mexicano, piensan que la estructura química es dependiente del clima, especie, altitud, etapa de recolección y principalmente del estado de crecimiento donde también mencionan sus características como el poder de inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, antifúngico primordialmente contra el patógeno oportunista de *Cándida albicans*. Los estudios fitoquímicos que realizaron detallan la estructura química identificando alcoholes alifáticos, derivados del fenilpropano y compuestos terpénicos; flavonoides, mencionando principalmente el timol y carvacrol detectando dieciséis a cincuenta y seis compuestos. Indican que el compuesto carvacrol y timol tienen niveles elevados de actividad contra microorganismo primordialmente contra los Gram negativos, siendo más activo el timol. Presentando como valor de la Concentración Mínima Inhibitoria para aceite esencial entre 0,28 a 1,7 mg/mL para bacterias 0,65-1,27 mg/mL⁶.

Los principales compuestos que identificaron en el aceite esencial del orégano (OEO) son carvacrol y timol, responsables del olor característico, actividad antimicrobiana y antioxidante; sin embargo, su contenido puede variar según la especie, la temporada de cosecha, y fuentes geográficas. Estas sustancias como agentes antibacterianos hacen que la membrana celular sea permeable debido a su impregnación en los dominios hidrófobos, por otro lado el aceite esencial tiene propiedades antioxidantes efectivas para retrasar la peroxidación de lípidos en los alimentos grasos y eliminar los radicales libres, este estudio analiza el estado sobre los usos reales y potenciales de aceites esenciales como aditivos alimentarios antimicrobianos y antioxidantes¹².

El compuesto principal en partes aéreas fue carvacrol (18,06%) seguido de timol (7,36%), gamma-terpineno (5,25%), p-cimeno (5,02%), limoneno (4,68%),

cariofileno (4,12%), cimeno (3,56%), ledeno (3,41%), linalool (2,47%), α -Pineno (2,15%), gamma-terpineol (2,10%) y germacreno-D (2,08%)¹³.

Reportes de investigaciones de la actividad genotóxica de *Origanum vulgare*, no han sido publicados hasta el momento, pero sí de otras plantas medicinales que presentan efecto genotóxico, como los que se menciona a continuación:

En el Centro de Indagación realizaron estudios donde citan que la sustancia activa de procedencia vegetal comúnmente usados en tratamientos terapéuticos, son aisladas de *Chenopodium multifidum*; *Styphnolobium japonicum*; *Lithraea molleoides* *Prosopis alba*; *Solanum sysimbriifolium*, *Schkuhria pinnata*; En este análisis de hierbas medicinales, concluyeron que 4 de las mencionadas, *Schkuhria pinnata* (canchalagua), *Solanum sysimbriifolium* (espino colorado), *Chenopodium multifidum* (paico); y *Lithraea molleoides* (Molle de beber), produjeron mal al Ácido desoxirribonucleico, produciendo degradación de la cadena simple y doble por ello es necesario controlar su consumo¹⁴.

Otro estudio donde evaluaron a *Julocroton triqueter*, una planta considerada antileishmanial donde los extractos tienen actividad antileishmanial; evaluaron el potencial de inducción genotóxica y de muerte celular (*in vitro* e *in vivo*). Dichos estudios genotóxicos *in vitro* realizaron con leucocitos humanos a concentraciones diferentes, para las pruebas *in vivo* los ratones suizos lo trataron con 125, 250 y 500 miligramo por kilogramo de extracto, inyectado por el interior de la cavidad peritoneal. Observaron una ausencia de efectos genotóxicos tanto *in vivo* como *in vitro* concluyendo que dichos extractos hidroalcohólicos de *Julocroton triqueter* no provocaron daños en el ADN a concentraciones y dosis bajas normalmente utilizadas para el tratamiento antileishmanial¹⁵.

Evaluaron la actividad genotóxica que podría causar el compuesto de alfa-asarona en células somáticas y gaméticas de vegetales, en esta investigación utilizó el sistema de micronúcleos en células meióticas de *Tradescantia* clon 4430 y en células meristemáticas de *Allium cepa*, sistemas que son altamente eficientes, sensibles y útiles para evaluar genotoxicidad. Estudiaron siete concentraciones: 30, 60, 90, 150, 180, 210 y 250 $\mu\text{g/ml}$ para cada uno de los sistemas, por triplicado; utilizó etanol al 1% como disolvente. Para *Tradescantia* se obtuvo un efecto genotóxico ($p < 0.05$) a las concentraciones de 180, 210 y 250 $\mu\text{g/ml}$ y con el sistema de *Allium cepa* los resultados muestran un efecto genotóxico a la concentración de 210 $\mu\text{g/ml}$, sin alteraciones en su índice

mitótico (9,0%), mientras que a 250 µg/ml se observa un efecto tóxico ($p < 0.05$) con inhibición de la división mitótica (0.12%). Por ello es conveniente restringir el uso de *Guatteria gaumeri* en tanto no se cuenten con otros datos de evaluación¹⁶.

Demostraron que la quercetina produce daños en el ADN en presencia de iones metálicos, utilizaron 7 flavonoides glicosilados naturales y 5 semisintéticos para investigar *in vitro* el daño del ADN dependiente del ión cúprico (Cu^{2+}). La mezcla de reacción, que contiene ADN monocatenario, diferentes concentraciones de flavonoides e ión cúprico en el tampón, incubados a temperaturas diferentes evaluando el daño del ADN mediante electroforesis en gel seguida de análisis densitométrico. La mezcla de reacción con quercetina a 4, 20 y 54°C indujo daño en el ADN de una manera dependiente de la concentración y la temperatura. Además, los resultados experimentales sugirieron que el grupo hidroxilo en la posición tres del anillo C produjo la capacidad más fuerte para inducir daño al ADN en presencia de iones cúpricos. La capacidad quelante de iones cúpricos también se evaluó con análisis espectroscópico, y la quercetina presentó la mayor capacidad quelante entre los flavonoides probados. Estos resultados sugieren que el grupo hidroxilo de 3 posiciones del anillo C es necesario para inducir daño al ADN a bajas temperaturas. Además, resultados del presente estudio también indican que la presencia de iones cúpricos disminuirá la actividad de las quercetinas glicosiladas, en términos de su capacidad para inducir daño al ADN.¹⁷

Examinaron dieciséis flavonoides, incluidos la quercetina y el kaempferol, para determinar su capacidad para promover la degradación del ADN inducida por el complejo bleomicina (BLM)-Fe. La degradación del ADN promovida por miricetina, quercetina, fisetina o kaempferol aumentaron considerablemente de una manera dependiente de la dosis hasta aproximadamente 20 a 50 mM. La concentración que produce la máxima degradación del ADN fue 20 mM para miricetina, quercetina y fisetina, y 50 mM para kaempferol, respectivamente. Los resultados indican los siguientes tres sustituciones de hidroxilo en el núcleo flavonoidal son esenciales para promover la degradación del ADN inducida por la combinación complejo BLM-Fe: la sustitución de hidroxilo C7 en el anillo A, la sustitución de hidroxilo C4' en el anillo B; y la sustitución de hidroxilo C3 en el anillo C¹⁸.

Identificaron varios compuestos con actividades antibacterianas en la miel, recientemente, descubrieron que las mieles poseen una actividad de degradación del ADN mediada por el peróxido de hidrógeno de la miel y un componente. La eliminación de H_2O_2 por catalasa eliminó las actividades bacteriostáticas causadas tanto por los fenólicos como por el H_2O_2 , lo que sugiere que la inhibición del crecimiento resultó de la química de acoplamiento entre estos compuestos. Tanto los fenólicos como el H_2O_2 participaron en la degradación del ADN por las mieles. El tratamiento del ADN plasmídico con H_2O_2 solo, no afectó la integridad del ADN, pero la eliminación del H_2O_2 de la miel por catalasa evitó la degradación del ADN. Los polifenoles extraídos de las mieles degradaron el ADN plasmídico en presencia de H_2O_2 en la reacción de tipo Fenton. El nivel de degradación del DNA se relacionó inversamente con la concentración de polifenoles, en contenido bajo, los polifenoles de la miel ejercen una actividad pro-oxidante que daña el ADN. En conclusión, los fenólicos de la miel con actividades pro-oxidantes fueron intermediarios necesarios que conferían la acción oxidativa del H_2O_2 y que la química de acoplamiento entre polifenoles y H_2O_2 , que resultó en la autooxidación fenólica y generación de especies radicales fue el mecanismo responsable de degradación del ADN por la miel. Los polifenoles de la miel emergieron como activos intermedios que son necesarios para conferir la acción oxidativa del peróxido de hidrógeno. Estos resultados demuestran un papel fundamental de las actividades antioxidantes de los polifenoles de la miel en la inhibición del crecimiento bacteriano y la degradación del ADN¹⁹.

Evaluaron la actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. y genotoxicidad, donde detallan que la mezcla de la molienda más el alcohol presentan una actividad genotóxica en los linfocitos en ensayo cometa, siendo este de raíces quién provoca actividad genotóxica con una concentración letal (CL50 35 ppm). Sin embargo muestra que el extracto elaborado con agua de las hojas manifiesta un bajo nivel genotóxico (CL50 900 ppm), lo que es importante si se toma en consideración el fragmento de la planta comúnmente utilizada²⁰.

Por otro lado la actividad genotóxica *in vitro* del zumo y extracto alcohólico de *Allium sativum*", determinado con método Tomasevich, por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% y bromuro de etidio al 1% visto en radiación de luz ultra violeta, a concentraciones de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, del extracto alcohólico del bulbo de *Allium sativum* no observaron

efecto frente al DNA genómico de *Staphylococcus sp*; sin embargo el zumo del bulbo de ajo, a concentraciones de 5, 10, 50 y 100%, presentaron un potente efecto, degradando el 100% del DNA, el cual concluyen que el zumo del bulbo de ajo muestra una fuerte acción de degradación al DNA genómico de *Staphylococcus sp*²¹.

Otros artículos menciona que los compuestos sintetizados por la planta identificados en el zumo de las flores de *Brugmansia arborea* (L.) Lagerh “floripondio” fueron: alcaloides, saponinas, azúcares reductoras y aminas en abundante cantidad; lactonas y/o cumarinas, flavonoides, taninos y fenoles en cantidad leve; mientras que en el extracto hidroalcohólico de las hojas, se identificaron: alcaloides, flavonoides, catequinas, taninos y fenoles, y aminas en abundante cantidad; azúcares reductores en cantidad moderada y en el efecto *in vitro* obtienen como resultado que el extracto hidroalcohólico de floripondio a una concentración de 50 miligramos por mililitro, fragmentó entre 40 a 95% de ADN y de 100 a 500 miligramos por mililitro, fragmentó más del 95% de ADN, refrendando con la prueba estadística de Kruskall Wallis (H=33,84, GL=8, P=0,000). El zumo de flores de *Brugmansia arborea* (L.) a concentraciones de 10% fragmentó entre 5 a 20% de ADN, y de 25 al 100%, fragmentó más del 95% de ADN, corroboraron además con la prueba de Kruskal-Wallis (H=18,4; GL=4, p=0,001). Concluyeron que frente al ADN genómico humano, el zumo de la flor de *Brugmansia arborea* (L.) demuestra mayor consecuencia que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Brugmansia arborea* (L.) Lagerh²².

La evaluación de degradación *in vitro* determinado por el ensayo Tomasevich, preparando dos tubos uno para látex cristalizado y otro para látex fresco, a concentraciones variadas como 1%; 2,5%; 5%; 10%; 25%; 50% y 100 %, 6 μ L de cada uno, enfrentó con 14 μ L de ADN humano a concentración de 1,500 ng/ μ L, utilizó como “blanco” látex al 100%, como “control” 14 μ L de ADN y un tubo que contenía el látex al 100%, 6 μ L de Proteinasa K y 14 μ L de ADN; obteniendo como resultado que todas las concentraciones experimentadas de 1% al 100% de látex fresco, han degradado completamente al ADN genómico humano; en lo que las concentraciones de 10%, 25% y 50% de látex cristalizado, degradó entre 20% al 40% del ADN y a concentración de 100% de látex cristalizado ha degradado entre el 40% al 95% del ADN genómico humano, muestra que la degradación del látex cristalizado si es dependiente de su concentración. Concluye que el látex fresco de papaya muestra una poderosa

acción de degradación del DNA ante ADN genómico humano, mientras tanto que la de látex cristalizado, es dependiente de su concentración²³.

Presentaron daño sobre el Ácido desoxirribonucleico genómico de *Staphylococcus aureus*, siendo los extractos de eucalipto y tara con mayor secuela a concentraciones de 50 mg/mL y 100 mg/mL. Finiquitó que el daño al ADN es dependiente de manera directa de la concentración del extracto hidroalcohólico y no del tiempo de incubación. De igual manera, reportó la detección de los siguientes metabolitos secundarios; en la tara se encontró flavonoides, fenoles y/o taninos, quinonas, alcaloides, y lactonas y/o cumarinas en cantidad exuberante a diferencia en eucalipto flavonoides en cantidad considerable, alcaloides, quinonas, lactonas, fenoles y/o taninos, cumarinas en regular cantidad²⁴.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. *Origanum vulgare* L. “orégano”

2.2.1.1. Ubicación taxonómica (*Origanum vulgare*)

La identificación de la muestra vegetal para el presente estudio (**Anexo 1**), tiene la siguiente ubicación taxonómica²⁵:

División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Sub clase : Asteridae
Orden : Lamiales
Familia : Lamiaceae
Género : *Origanum*
Especie : *Origanum vulgare* L.
Nombre Vulgar : “orégano”

2.2.1.2. Descripción botánica

Plantas vasculares, rizomatosa, perenne muy aromáticas, presentan tallos rectos, de una medida de 45 centímetros variable, habitualmente ramificados en la parte preeminente, de ramificación opuesta son vellosos, pubescentes, hirsutos o rara vez glabros. Sus hojas de unos 10x25 milímetros, son completas o sutilmente crenacio-serradas, ovaladas, glabras o pilosas, pecioladas más verdes en el haz que el envés. Sus flores están dispuestas en espiga de verticilastros de 5-30 mm, ovoide, tienen inflorescencia corimbosa densa. Brácteas florales de 4-5 mm, distinta a las hojas, más largas que el cáliz, oblongas u ovaladas no apiculadas, pilosas o glabras, sin glándulas o

ligeramente punteado-glandulosas, herbáceas, de color púrpura violáceo, el cáliz, de glándulas amarillas, la corola de tamaño de 4-7 milímetros, bilabiada, con el labio superior entero a diferencia del inferior trilobulado, de colores rojo o blanco, el androceo formado con 4 estambres, con los filamentos divergentes. Su inflorescencia se da entre los meses de julio hasta septiembre²⁶. Originaria de Asia occidental y Europa, que se acomoda a una variedad de tipo de suelos, Caméfito tiene la capacidad de habitar en lugares secos y montañosos formando pequeñas matas, tiene un favoritismo por los suelos calizos, tiene la necesidad de un clima templado y humedad²⁶.

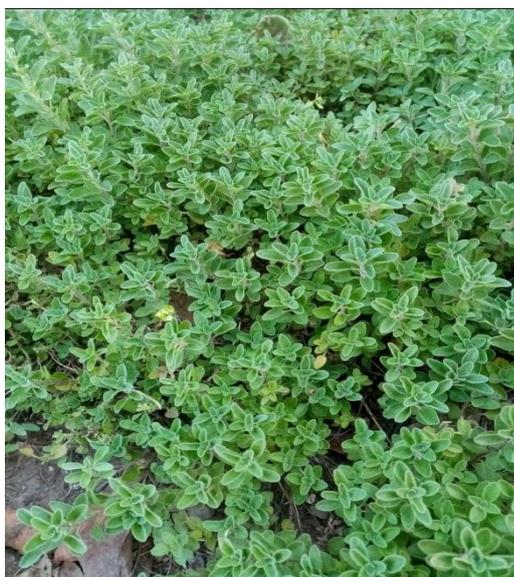


Figura 1. Parcela de terreno con plantas de orégano.

2.2.1.3. Propiedades medicinales del orégano

El orégano tiene usos culinarios, cosméticos y medicinales son utilizados de manera seca o también utilizan de manera fresca tiene usos farmacológicos tradicionales estudios demuestran varias de sus propiedades terapéuticas antiinflamatorios, analgésicos, antipiréticos pueden ser sedantes, antidiarreico, algunos lo usan en tratamiento de infección anti fúngica, cutáneas en tratamiento de desórdenes hepáticos, diurético, para dolores menstruales, antimicrobiano, repelente contra insectos, antimalaria, antiespasmódico, tratamiento de enfermedades respiratorias, abortivo y anestésico local.⁶ También se menciona que *Origanum vulgare* es una fuente natural importante para la conservación de diferentes alimentos o cosméticos²⁷.

2.2.1.4. Composición química del orégano

Existen diversidad de indagaciones que se basaron en la estructura química del *Origanum vulgare*, utilizando aceites esenciales, extractos acuosos

reconociéndose diversidad de compuestos químicos por ejemplo flavonoides como apigenina, agliconas, la luteolina, alcoholes alifáticos, compuestos que se derivan del fenilpropano y terpénicos, de igual manera elementos activos como los fenoles (carvacrol y timol); sesquiterpénicos (β -cariofileno y β -bisaboleno), hidrocarburos monoterpénicos (α -pineno, limoneno, β -pineno y p-cimeno); linalol, terpinen-4-ol y ácidos fenólicos (ácido cafeico, rosmarínico en planta y hoja y ácido clorogénico), taninos, terpenos de treinta carbonos provenientes del ácido oleánico y ursólico pero en distintas indagaciones realizados por cromatografía de gases - espectrometría de masas se han encontrado de dieciséis a cincuenta y seis compuestos diferentes⁶.

2.2.1.5. Aceites esenciales

Las plantas generan una enorme porción y variedad de compuestos orgánicos una de ellas son los aceites esenciales que poseen una funcionalidad directa en su desarrollo y crecimiento, sustancias conocidas con el nombre de productos secundarios o metabolitos secundarios. Característica que se puede mencionar es que no poseen funcionalidad inmediata en el proceso de la respiración fotosíntesis, síntesis de proteínas, transporte de solutos, asimilación de nutrientes, formación de carbohidratos y proteínas de las plantas, su contenido cambia dependiendo de la especie, zona geográfica, tiempo de cosecha, localización geográfica, sitio de cosecha, el clima y otros componentes condicionantes ecológicos²⁸. Se ha reconocido que los elementos primordiales del aceite etéreo de *Origanum vulgare* son timol y carvacrol en 65,8% y el p-cimeno (11-42%); mientras tanto que en el género *Lippia* el carvacrol se muestra en un 13% y en timol un 12,5%. El aceite etéreo del orégano tiene sustancia química que ayudan a su poder curativo, como carvacrol y timol, trabajan como antioxidantes y antisépticos a medida que los terpenos, pineno y terpineno, poseen características antiinflamatorias, anestésicas, antisépticas y antivirales. Compuestos como bonreol y Linalool presentan doble cadena de alcoholes que poseen características antisépticas y antivirales. Consideradas producto del metabolismo secundario de las plantas al igual que ciertos alcaloides, saponinas, taninos y flavonoides⁶. No obstante los aceites esenciales del orégano tienen la posibilidad de ser catalogados como tóxicos, al ser ingeridos en dosis altas tienen la posibilidad de provocar efectos narcóticos, evidenciados en indicios como sueño desmesurado (somnia) o adormecimiento de ciertas partes del cuerpo⁶.

2.2.2. *Escherichia coli*

Una de las especies bacterianas más meticulosamente estudiadas y no únicamente por sus habilidades patogénicas, sino además como sustrato y modelo de indagaciones, unas de las especies bacterianas más comunes de la microbiota intestinal; se muestra como un comensal del intestino humano escasas horas desde el nacimiento²⁹. Fermenta la lactosa y glucosa, oxidasa negativos y catalasa positivos, reduce nitratos a nitritos, tienen la posibilidad de ocasionar diarrea y otras patologías al ser ingeridas³⁰. Para establecer su grupo patógeno, Kauffman elaboró un esquema que consiste en la caracterización generalmente por aglutinación en la actualidad presenta 60 capsulares (K), 112 flagelares (H) y 176 antígenos somáticos (O). El antígeno somático "O" causante del serotipo; la denominación del antígeno flagelar y somático nos da el serogrupo, la determinación de serotipos es la primera técnica que nos posibilita distinguir a población de microorganismos de una sola especie patógena de las comensales, esta se hace por medio del análisis de las características de virulencia que permanecen de manera directa ligadas a la patogenicidad de la bacteria, se han descrito varios componentes que intervienen en la patogenicidad de *Escherichia coli*, entre ellos se hallan los componentes de unión que viene definida por la existencia de fimbrias, esta incorporación se hace por un prótido de la membrana externa llamada intimina, que juega un rol importante en el anclaje de *Escherichia coli*, en células epiteliales de mamíferos, favoreciendo la primera fase de la colonización³¹. *Escherichia coli* se divide en algunas categorías según con sus propiedades serológicas y características de virulencia, los serotipos capaces de provocar diarrea son *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), y la más peligrosa es la *Escherichia coli* enterohemorrágica, además llamada *Escherichia coli* verocitotóxica (EHEC o VCEC) conocidas como fabricantes de toxina Vero que son similares a Shiga del serotipo O157: H7, integrante más infame de *Escherichia coli* que puede provocar disentería sanguinolenta y fiebre³².

2.2.2.1. Características del ADN bacteriano

Poseen la función de habituación a diferentes condiciones del medio ambiente, para entender esa capacidad es de suma trascendencia saber las bases genéticas, saber cómo regulan y realizan su expresión, cómo está estructurada su información genética y que mecanismos de alteración génica tienen. La

capacidad infecciosa de las bacterias patógenas está en que tienen la información génica elemental para invadir los tejidos del huésped, crear sustancias que ocasionan la patología. Sin embargo, el conocimiento del desempeño genético, sumado al elaborado de que son de simple funcionamiento en el laboratorio y que poseen incremento veloz, dichas propiedades permiten aprovecharlas para elaborar productos benéficos en la medicina, para la prevención, diagnóstico de las enfermedades³³.

2.2.2.2. Estructura del ADN bacteriano

La información génica en la bacteria está constituida en la molécula del ADN de doble cadena y circular, cerrado por enlace covalente, molécula llamada cromosoma bacteriano, muchas bacterias tienen además ADN extracromosómico, designado ADN plasmídico por estar comprendido en los plásmidos, las bacterias en términos bioquímicos presenta sus ácidos nucleicos la misma estructura y composición que para cualquier célula, el primer fosfato se une al nucleósido por medio de un enlace éster con el grupo hidroxilo del carbono 5' de la pentosa, por lo tanto las moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de un nucleósido y un grupo fosfato se enlazan por enlace fosfodiéster de esta manera dar lugar a cadenas de polinucleótidos, el enlace fosfodiéster presente entre el C-5'-fosfato de un nucleótido y el C-3'-hidroxilo del siguiente nucleótido, Los nucleótidos que conforman las cadenas de ADN contienen bases nitrogenadas como adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T), las bases nitrogenadas de una de las cadenas del ADN se incorporan por medio de puentes de hidrógeno a las bases nitrogenadas de la otra cadena, de manera que A se une a T, y G a C los pares de bases se mantienen unidos por medio de dos enlaces de hidrógeno entre A y T, y tres enlaces de hidrógeno entre G y C. Así formar unidades denominadas pares de bases. Cada base se encuentra unida a una molécula de azúcar y una molécula de fosfato. Los nucleótidos son formados por la base, azúcar y un grupo fosfato. Los nucleótidos están dispuestos en dos hebras largas que forman un espiral denominadas doble hélice. La estructura de la doble hélice es como una escalera, con los pares de bases formando los escalones, las moléculas de azúcar y fosfato formando las piezas laterales verticales de la escalera, además la G y A se denominan purinas, en lo que T, U, y C se llaman pirimidinas. Se pueden distinguir pares de bases o pares de nucleótidos, en la estructura de doble hélice del ácido desoxirribonucleico, Dichos pares de base tienen la posibilidad de

utilizarse como unidad de tamaño para las moléculas de ADN, de esta forma podemos indicar por ejemplo que el ADN cromosómico de *Escherichia coli* posee un tamaño de 4,2 millones de pb lo cual es lo mismo de 4.200 kilobases (Kb) ^{33,36}

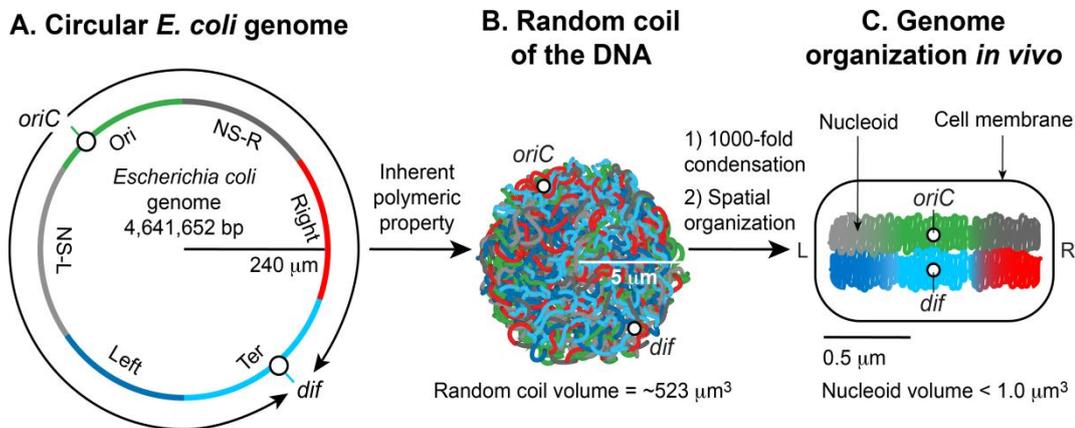


Figura 2. Formación del nucleoide de *Escherichia coli* ³⁴.

El ADN genómico bacteriano reside dentro de las células en una forma altamente condensada y funcionalmente organizada llamada nucleoide. El cromosoma de *Escherichia coli* está compuesto por ADN genómico, ARN y la proteína, dicho cuerpo nuclear aparece por disposición funcional y condensación de un solo DNA cromosómico con la ayuda de proteínas cromosómicas y moléculas de ARN, así como el superenrollamiento de ADN³⁴. Para mayor estudio secuenciaron el genoma de *E. coli* O157: H7 para identificar genes candidatos responsables de la patogénesis donde la estructura del genoma tiene 1,387 genes nuevos codificados que incluyen factores de virulencia candidatos, capacidades metabólicas alternativas, varios profágicos y otras funciones nuevas, todas las cuales podrían ser objetivos para la vigilancia³⁵

2.2.2.3. Extracción de ADN bacteriano

Los métodos para aislar ácidos nucleicos son variados, procedimiento por el cual se obtiene el ADN a partir de las células³⁶. La separación de sustancias consiste en aislar el ADN de otros compuestos celulares con el objetivo de poder indagarlo o manipularlo. La extracción de ADN son la base en biología molecular, a partir de una cepa pura de *E. coli*, se realizaron cultivos en caldo Müller Hinton con los cuales se elaboró un banco de ADN genómico para las diferentes evaluaciones. Este procedimiento permite una rápida extracción del ADN y obtener una buena calidad de ADN de la cepa. La homogeneización de la cepa es el primera acción en la extracción los detergentes son aptos de romper la membrana celular y liberar el ácido nucleico de las células del cual se extraerá

el ADN³⁶. El protocolo para romper la célula de ser crítica y agresivo para lograr la fragmentación del tejido y lisis de la membrana celular, sin dañar el ácido nucleico. Después eliminar restos celulares y las proteínas para ello añadir una solución de precipitación de proteínas. Luego de una centrifugación obtenemos el sobrenadante para luego precipitar los ácidos nucleicos con isopropanol, seguido de un lavado con etanol al 70% por último la hidratación del ADN³⁷.

2.2.2.4. Proteinasa k

Utilizada usualmente en biología molecular para destruir la proteínas y eliminar la contaminación en la aislación de ácido nucleico, cuando se añade a las preparaciones de ácido nucleico inactiva velozmente las nucleasas que de otro modo, podrían degradar el ADN o el ARN durante la purificación, la enzima actúa en presencia de químicos que desnaturalizan proteínas, como agentes quelantes EDTA, SDS, En conclusión inactiva de forma eficaz las ADNasas y RNasas eficaz en el aislamiento de ADN o ARN debido a que la mayor parte de las ADNasas y RNasas microbianas o de mamíferos son rápidamente inactivadas por la enzima, exclusivamente en presencia de SDS al 0,5-1%³⁸.

2.2.2.5. Cuantificación y determinación de pureza de DNA

Purificar los ácidos nucleicos es un tarea fundamental para la realización de diversas técnicas de biología molecular, uno de los factores importantes para los subsecuentes análisis moleculares³⁷; hay procedimientos de conteo de ácidos nucleicos las más utilizadas tenemos la espectrofotometría y fluorescencia³⁹. Los espectrofotómetros son equipos usados para medir la concentración de ácidos nucleicos en solución. En la celda del espectrofotómetro una luz atraviesa la solución de ácidos nucleicos y una vez que atraviesa por la muestra, el fotodetector mide la magnitud de luz absorbida. A medida que más luz absorba la muestra más grande va a ser la concentración de ácidos nucleicos³⁶.

Se debe tener en cuenta diversos factores como la concentración, pureza, integridad y funcionalidad⁴⁰. La pureza del ADN no debe contener posibles contaminantes, como ADN degradado, nucleótidos, cebadores, proteínas, compuestos aromáticos, alcoholes, sales (buffer), es decir es una forma de control de calidad del ADN. De esta manera la concentración se calcula teniendo presente el valor de absorbancia a una longitud de onda de 260 nanómetros. La interacción de absorbancias A_{260/230} y A_{260/280} usadas para evaluar la pureza de muestras. Dado que las proteínas absorben luz a una longitud de onda de 280 nanómetros, comúnmente el índice de absorción a 260÷280 nm es

utilizada para apreciar la pureza de los ácidos nucleicos con respecto a la contaminación con proteínas. Una vez que se encuentra entre 1.8 y 2.0, se estima de buena calidad, debido que valores cercanos a 1.8 indican que la muestra está formada solo con ADN. La presencia proteica hace reducir la concentración de ADN, por ello si la relación 260÷280 es menor que 1.8 la proteína en la muestra es alta es necesario realizar otra vez la extracción. Valor mayor a 2.0 nos hace mención que sucedió un fragmento de las cadenas de ácidos nucleicos, por ello la consideración que el ácido nucleico es de mala calidad y se recomienda una nueva extracción. Si no se puede cuantificar por la insuficiente cantidad de ADN obtenido (<250ng/ml) o tenemos el ADN contaminado con varios compuestos que están absorbiendo la radiación ultravioleta, podemos utilizar la fluorescencia por luz UV que emite el bromuro de etidio al intercalarse en el ADN, la relación entre la concentración del ácido nucleico y la intensidad de emitir fluorescente es relacionada de manera directamente. De este modo podemos estimar el valor de ácido nucleico, comparando la fluorescencia originada por la muestra estudiada con una serie de patrones⁴¹.

2.2.2.6. Electroforesis en gel de agarosa

El fundamento de electroforesis está basada en migración de las moléculas mediante el gel de acuerdo al tamaño, carga eléctrica y peso molecular desplazamiento desarrollado por campo eléctrico³⁶. Técnica que posibilita la generación de un campo eléctrico alrededor del gel donde se colocan las muestras. El campo se realiza con la solución amortiguadora donde se encuentra dentro el gel con las muestras; la transmisión de corriente eléctrica es generada por el alto contenido de electrolitos, el pH se mantiene al paso de la corriente. La electroforesis tiene 2 polos conectadas a la fuente de energía. Existen dos tipos de electroforesis una vertical donde el polo positivo está situada en la parte inferior a diferencia del horizontal que puede estar ubicado en cualquiera del los extremos. En los distintos tipos los polos positivos están representados rojo en cambio el negativo de negro. La técnica está basada en estancar las muestras en el matriz de consistencia porosa, para luego someter a corriente eléctrica durante un lapso de tiempo. Cada material empezará a recorrer por los poros del gel- la rapidez dependerá del tamaño molecular y carga eléctrica. Una vez que la separación ha completado detener el paso de corriente para luego colorear y se puedan visualizarse. Encontraremos a la a

distancias diferentes en comparación al inicio. Los ácidos nucleicos son solubles por presentar su grupo fosfato presentes en la estructura de manera regular, poseen la agilidad de desplazarse por un campo eléctrico por consiguiente, son delicados de ser aislado por electroforesis. Las moléculas se desplazaran al polo positivo, en consecuencia transcurrirán en dicha dirección por la superficie del gel, alejándose por tamaño (n^0 de nucleótido), en el momento de colocar la muestra se añade el marcador de frente que se conoce como loading, posibilita para la electroforesis en el instante que veamos conveniente, por ultimo con el fin de apreciar las líneas colorear el gel con el bromuro de etidio, quién se caracteriza por ser un aclarador de ácidos nucleicos y es un agente intercalante con capacidad de transmitir luz al momento de entrar en contacto con luz ultravioleta⁴².

2.2.3. Factores que afectan la estabilidad del ADN

Durante los últimos años, la población humana se ve afectada en su integridad genética debido a la exposición con productos químicos llamados agentes genotóxicos. Por otro lado, existen factores que influyen en la integridad cromosómica como cambios climáticos, tratamientos médicos, estilo de vida. Es importante, por todo ello, hacer estudios de genotoxicidad con frecuencia y monitorizar aquellas sustancias que puedan hacer sufrir alteraciones, capaces de modificar la estabilidad genética. Por ello la toxicología de genes evalúa las consecuencias de los agentes químicos, físicos y algunas toxinas vegetales sobre el material hereditario (ADN) como las secuelas en la salud humana por exposición a mutágenos, teniendo en consideración como tal a cualquier agente que produzca mutaciones génicas, remplazos en las bases, pirimidinas por pirimidinas, purina por otra purina o pirimidinas por purinas o viceversa, remplazo de una base por una sustancia análoga causando un nucleótido incapaz en la duplicación, aberraciones cromosómicas estructurales (poliploidías y aneuploidías) por afecciones en las partes del aparato meiótico o mitótico) o variaciones al ADN (alquilación de bases, formación de aductos, intercalamiento de bases) y rupturas de la cadena de ADN. Las plantas medicinales no llevan una indicación metodológica específica para el ensayo genotóxico, estos deben ser regulados al igual que los fármacos, dicho estudio genotóxico de extractos de plantas medicinales debe ser realizada mediante pruebas *in vitro*, que midan el daño en los niveles de mutaciones cromosómicas y genéticas. Las pruebas genotóxicas están elaboradas para identificar sustancias que causan de manera

indirecta o directa lesión en el ADN por distintos mecanismo, siendo requisito primordial la apreciación mutagénica para la descripción toxicológica de un producto químico⁴³.

2.2.4. Efecto de los metabolitos secundarios sobre el ADN

Los compuestos químicos que se encuentran en plantas medicinales pueden relacionarse de manera indirectamente o directa con el ADN, ocasionando variación que perjudican la función de la célula y que a un prolongado tiempo ocasionan desorden en la salud. Por eso es importante detectarlos en sus etapas iniciales, la acción sobre el material genético¹⁴. Las plantas poseen capacidad de producir compuestos, la mayoría relacionados con fenoles simples (timol, ácido antémico, terpenoide); quinonas, taninos, cumarinas, flavonas, alcaloides. Dichas plantas productoras de los compuestos fenólicos simples como el pirogalol, catecol y los ácidos cafeico y cinámico son la manzanilla (*Matriarca chamomilla*), el tomillo (*Thymus vulgaris*), y la *Arctostaphylos uvaursi* (gayuba), cuyo principio activo, es la arbutina utilizado en tratamientos contra la infección urinaria. Los grupos hidroxilo en el anillo tienen relación de toxicidad con los microorganismos y el aumento en la hidroxilación está relacionado a una mayor toxicidad. Dentro de estos cabe recalcar a los aceites etéreo, compuestos que causan el olor agradable de las plantas y algunos con poder antimicrobiano como el mentol que obtenida de la menta (*Menta piperita*) y la capsaicina obtenida del pimiento rojo (*Capsicumm Annuum*). La warfarina, un anticoagulante donde su mecanismo de acción es mediante interacción con el DNA, manifiesta también su acción antiviral, al igual que la flavona son estructuras fenólicas, tienen un grupo carbonilo. Forman la familia más extensa de fenoles, su trabajo frente a los microorganismos se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares con las células de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas. Las catequinas, presentes en *Camellia sinensis* (té verde) realizan acción frente a *Shigella*, *Streptococcus mutans*, y *Vibrio cholerae*. Otros flavonoides presentan actividad antiviral, como la glicirricina, sintetizada por el regaliz (*Glycyrrhiza glabra*). Por último los alcaloides cuyo mecanismo de acción es por la intercalación del ADN del microorganismo y entre la pared celular⁴⁴.

Las sustancias fenólicas y monoterpenos que contienen los aceites esenciales actúan fragmentando los lípidos de la membrana citoplasmática de los microorganismos, así favoreciendo el flujo de electrones y de otros contenidos

celulares, la pérdida de las partículas y compuestos conduce a la muerte de los microorganismos, de manera más minuciosa se puede mencionar que el timol y carvacrol actúan en la membrana celular, ocasionando su desestabilización y aumentando su permeabilidad, el desorden de los sistemas enzimáticos y la producción de energía⁴⁵.

2.2.5. Genotoxicidad

Se denomina a la función de provocar daño en el ADN por agentes químicos, físicos o biológicos⁴⁶. Las sustancias genotóxicas tienen la posibilidad de unirse de manera directa al ADN o actuar de forma indirecta por medio de la afectación de las enzimas relacionadas en la duplicación del ADN y ocasionando cambios que tienen la posibilidad de desembocar o no en un proceso canceroso⁴⁷. El mal inducido en el ADN incluye no solamente al ADN, sino además a todos esos elementos celulares que se hallan involucrados con la función y comportamiento de los cromosomas en la célula. Ejemplos de ello son las proteínas que intervienen en la descondensación y condensación, en la reparación del ADN en el cromosoma u otras organizaciones como el huso acromático, responsable del reparto de las estructuras altamente organizadas, formadas por ADN y proteínas a lo largo de la separación celular, además son denominados genotóxico y mutágenos. Esta acción de inducir daño está relacionada por la dosis recibida, e tiempo y el mecanismo por el cual la sustancia entra en contacto con los seres vivos, junto a la formación genética del individuo que puede conceptualizar una sensibilidad propia o especial⁴⁸.

2.2.5.1. Efecto clastogénico y aneugénico

Los agentes clastogénicos tienen la capacidad de provocar rupturas cromosómicas y los aneugénicos son los que provocan la pérdida de cromosomas enteros o grupos de cromosomas. Para demostrar el efecto clastogénico de un agente físico, químico o biológico se hace uso de una batería de ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* utilizando técnicas conocidas, validadas y repostadas en la literatura. Uno de los ensayos que demuestra lo mencionado es el de aberraciones cromosómicas, que como su nombre lo dice, permite detectar a nivel de los cromosomas alteraciones estructurales (efecto clastogénico) o alteraciones numéricas (efecto aneugénico)⁴⁹.

2.2.5.2. Ensayos *in vitro* e *in vivo*

El ensayo de genotoxicidad está elaborado para identificar sustancias que conllevan de forma indirecta o directa lesión en el ADN por varios mecanismos.

El análisis se realiza por distintos ensayos *in vivo* e *in vitro*, de dificultad variable⁵⁰. Se usan en la investigación científica para identificar daño a los genes, como el ensayo de micronúcleos, además puede desarrollarse en la célula epitelial obtenida de las mucosa, aberraciones cromosómicas, el ensayo de cambio de cromátidas hermanas; ensayo cometa un método electroforético en microgel de agarosa considerada muy sensible para identificar la lesión en el DNA, a grado de la unidad anatómica fundamental individual que posibilita demostrar los fragmentos de doble cadena del ADN así mismo de cadena simple y cruzamientos entre ácido desoxirribonucleico /ADN o ADN proteína que se relacionan con los lugares de reparación por escisión inconclusa en ciertas células. Una vez que el núcleo se somete a electroforesis, los fragmentos del ácido desoxirribonucleico se desplazan fuera del mismo, observándose como una cometa debido a ello el nombre de dicha técnica⁵⁰.

2.2.6. Ensayo de exposición directa del ADN bacteriano a extractos vegetales

Miranda⁵¹. Diseña un procedimiento para demostrar el efecto de degradación del ADN una vez que se expone de manera directa a extractos vegetales conteniendo metabolitos secundarios. Plantea la necesidad de saber que parte de la planta por ejemplo pueden ser usadas las flores, hojas, tallos, frutos y las semillas pueden ser utilizadas como remedios caseros y conseguir extractos, obtenidos con la mezcla de agua más alcohol u otra manera sólo con agua pero hay variedad de solvente orgánico con que se puede realizar la extracción, también se puede utilizar para hacer estudio el látex o zumo, propone obtenerla de manera directa. La metodología se apoya en elaborar soluciones a diferentes concentraciones: 1, 2,5, 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL; para la situación de látex elaborar concentraciones de 1, 2,5, 5, 10, 25, 50 y 100 %. Sin embargo, adquirir ADN del organismo con que se está trabajando que puede ser microbiano, animal, vegetal, humano esto por medio un kit comercial o de manera convencional denominada sustracción orgánica, tratando que el DNA obtenido esté completo, posteriormente elaborar 200 µL a concentración de 1,500 ng/µL. Para mostrar el impacto de degradación del ADN *in vitro*, se elabora un grupo de tubos de 500 µL etiquetados; se deposita 14 µL de ADN del stock en los tubos, después se añade 6 µL de todas las concentraciones de látex y extracto que corresponden, un tubo se utiliza como "blanco", añadiendo 14 µL de extracto o latex al 100 % más 6 µL de agua bidestilada; además hay un tubo como

“control”, colocando 14 μ L de ADN; al final el tubo que se utiliza para la eliminación de las enzimas nucleasas, añadiendo 14 μ L de ADN y 6 μ L de extracto o látex al 100 %, más 6 μ L de la enzima proteinasa K. Los tubos se incuban en baño María por una hora y si es necesario hasta cuatro horas. Los productos de cada tubo, además del marcador de tamaño molecular son llevados a electroforesis a un voltaje de 40 por un lapso 3h en gel de agarosa, luego colorear con bromuro de etidio al 1% para después visualizar en radiación de luz ultravioleta, se toman fotografías que revelan la actividad de degradación del ADN de las diversas concentraciones evaluadas; el “blanco” utilizamos con el fin de revisar que no existe ADN contaminante en el látex o extracto; el “control” se utiliza para equiparar la proporción de DNA sin tratamiento, en relación a los tubos que recibieron tratamiento; y eliminación de nucleasas para verificar el impacto por acción de los metabolitos secundarios, mas no por la actividad de la nucleasa, ya que ellas estarían inactivadas por acción de la proteinasa K a lo largo del lapso de incubación. El grado de degradación basado en su fragmentación es comparable en porcentaje, llevando a una escala numérica de 5 clases: 0, 1, 2, 3, y 4, basados en la clasificación del “ensayo cometa” que fue planteado por Collins y Speit (1995).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

Este estudio fue desarrollado en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH) en Ayacucho de febrero a octubre del 2019. El proceso de tamizaje fitoquímico de *Origanum vulgare* L. “orégano”, se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de Facultad de Ciencias de la Salud. La ubicación taxonómica realizada por la Bióloga Laura Aucasime (**Anexo 1**); el ADN bacteriano de *Escherichia coli* así como los ensayos de degradación *in vitro* fueron realizados en los ambientes de Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas.

3.2. Definición de la población y muestra

3.2.1. Población

Origanum vulgare L. Procedentes de la localidad de Muyurina 13°06'49.1"S 74°11'32.5"W del distrito de Tambillo, provincia Huamanga, Ayacucho.

3.2.2. Muestra

Conformada por 3 kg de hojas y tallos de *Origanum vulgare* L. “orégano”.

3.2.3. Muestreo

El muestreo fue de manera dirigida. Así obteniendo un grupo de la población a manera de elección y dependiendo de las características del estudio.

a) Criterios para la inclusión

Plantas de *Origanum vulgare* L. “orégano” frescas y perfecto estado

b) Criterios para la exclusión

Plantas de *Origanum vulgare* L. “orégano” secas y deteriorados.

3.2.4. Lugar de muestreo

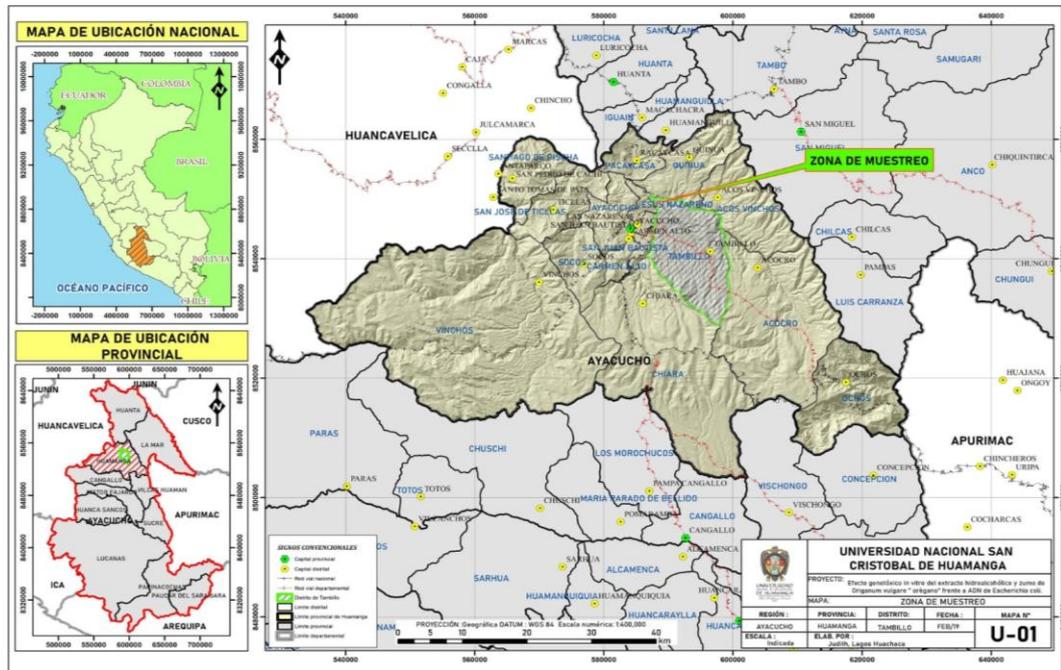


Figura 3. Mapa de ubicación de la localidad de Muyurina, lugar del muestreo.

3.3. Unidad experimental

Ácido Desoxirribonucleico bacteriano de *Escherichia coli* en concentración de 1500 ug/μL por cada prueba.

3.4. Procedimiento

3.4.1. Recolección de plantas de orégano

Las muestras de orégano recolectadas fueron inmediatamente transportadas al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para su secado correspondiente a temperatura ambiente, separando aquellas que muestren signos de alteración. La denominación taxonómica se realizó con la Blga. Laura Aucasime Medina (**Anexo 1**).

3.4.2. Obtención de polvo de orégano

Secado. lavadas con agua a presión a fin de remover los vestigios de tierra, para luego colocarlos bajo sombra en temperatura ambiente teniendo como base el papel kraft que fueron cambiadas a diario para obtener un secado parejo y evitar una descomposición a consecuencia de la humedad (**Anexo 3**).

Molienda. Se realizó en mortero de porcelana previamente esterilizado, las muestras secas de orégano se molieron hasta obtener un polvo fino; mientras que, para obtener el zumo fue con muestras frescas (**Anexos 4 y 5**).

3.4.3. Obtención del extracto hidroalcohólico y zumo de orégano

La preparación del extracto hidroalcohólico se realizó con 1kg de hojas y tallos de orégano, anticipadamente secado y en buen estado, para luego triturarlas en mortero previamente esterilizado en autoclave, con el objetivo de minimizar hasta un polvo fino en seguida se pesó 100g de la molienda y se vació en un frasco de vidrio color ámbar, añadimos 1L de solvente etanol: agua (3:1) que resultó de mezclar 750 mL de etanol de 96° con 250 mL de agua destilada estéril; sobrepasando a la muestra por casi 1 cm, sacudimos el frasco por un promedio de 15 minutos de dos a tres veces al día, por un periodo de 5 días de la maceración, este acto se realizó para que nuestro solvente se distribuya homogéneamente, el frasco de maceración lo mantuvimos en un ambiente frío y en ausencia de luz. Por último filtramos con papel filtro, y llevamos al evaporador rotatorio BUCHI-3000, finalmente colocamos para el secado en la estufa MEMMERT a 37°C. Con éste extracto fue que realizamos la determinación cualitativa fitoquímica y preparamos distintas concentraciones para la prueba de degradación.

Para conseguir el zumo utilizamos 200g de orégano fresco, trituradas en mortero esterilizado en autoclave filtramos con una gaza esterilizada y después en papel filtro esterilizado, presionando para obtener el filtrado, con ello se hizo la determinación cualitativa fitoquímica al igual que el anterior se prepararon varias concentraciones para el análisis de degradación del ADN. (**Anexo 6 y 7**)

3.4.4. Análisis fitoquímico

Se llevó a cabo el tamizaje fitoquímica cualitativo al extracto hidroalcohólico y zumo que obtuvimos del orégano respectivamente, para conocer los diferentes metabolitos secundarios que estén presentes en la planta (**Anexo 8**).

3.5. Cultivo de *Escherichia coli* y obtención de ADN genómico

Realizamos rejuvenecimiento de la cepa *Escherichia coli*. (**Anexo 2**) en caldo EC (*Escherichia coli*) incubándose a 37°C por 24h, luego se sembró por agotamiento en superficie sobre agar Müller-Hinton (MH) incubándose a 37°C por 24h, con el fin de obtener la masa celular bacteriana y conseguir el ADN genómico⁵⁴. (**Anexo 9 y 10**).

1. incorporamos 400 µL de buffer TE 1X en el tubo eppendorf de 2 mL para transferir con un asa de platino 100 mg aproximadamente de masa celular del cultivo joven de *Escherichia coli*.

2. Incorporamos 60 μL de Lisozima (10 mg/mL) para luego poner a 37°C de temperatura por un lapso de 2h en el equipo de baño María.
3. Añadimos SDS/proteinasa K (75 μL SDS 10% + 5 μL PK 10 mg/mL) e incubamos a 65°C por 15 min.
4. Adicionamos 100 μL NaCl 5M, 5 μL de CTAB (N-cetil-N, N, N-Trimetil bromuro de amonio) y dejar a 65°C por un periodo de 15 min.
5. Como paso siguiente 750 μL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), homogenizamos sacudiendo delicadamente por un periodo de cinco minutos para luego centrifugar a 14000 rpm por 15 min.
6. Se observa la formación de dos capas en el tubo eppendorf, se trasladó delicadamente el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf.
7. añadimos 600 μL Isopropanol helado al 100%, para después llevarlo a incubación a - 20°C por toda la noche.
8. Centrifugamos a una revolución de 14 000 rpm durante 15 min para luego descartar el sobrenadante.
9. Utilizamos en la incorporación 1 mL de etanol al 70%, para luego llevar a la centrifuga a 14 000 rpm por diez minutos.
10. Eliminamos el sobrenadante para después rehidratar el sedimento con 50 μL de agua bidestilada estéril.
11. Utilizamos 1 μL ARNasa de 20 mg/ μL e incubar a 37°C durante 1 h.
12. Por ultimo almacenamos a - 20°C hasta realizar las pruebas.

Tabla 1. Propiedades producidas en los ensayos en la identificación de los metabolitos secundarios de plantas⁵³.

Metabolitos secundarios	Ensayos: con reactivos	Observación
	Dragendorff	
Alcaloide	Mayer Hager Wagner	Formación de precipitado en las reacciones.
Cumarina y Lactona	Baljet	Formación de precipitado de coloración naranja a roja.
Flavonoide	Shinoda	Coloración amarilla, naranja, carmelita o rojo en la fase amilica.
Quinona	Borntrager	Cuando es positivo la fase amoniacal presenta color rojizo.
Catequina	Catequinas	Coloración verde carmelita a luz uv, indica positivo.
Saponina	Espuma	Positivo cuando hay formación de espuma en la superficie.
Azúcar Reductor	Benedict	Positivo presenta formación de precipitado rojo ladrillo.
Tanino y fenol	Cloruro férrico	Formación de una coloración verde intenso, azul o negruzca.
Aminas (aminoácidos)	Ninhidrina	Se da coloración violeta.
Cardenólidos	Kedde	Coloración violácea.

3.6. Valoración del ADN extraído

3.6.1. Determinación de la concentración con espectrofotómetro

- Mesclamos lentamente (por diez veces), el ADN con la micropipeta de medida de 100 μ L anticipadamente desinfectada.
- Se acomodó el espectrofotómetro UV de la marca Eppendorf Bio Photometer ® plus, con opción de medir el ADN.
- Para la higiene de la zona de muestra del adaptador se colocó 2 μ L de agua bidestilada estéril para luego absorber el agua con papel "tissue", y tener una excelente limpieza repetimos dos lavadas.
- De nuevo se colocó 2 μ L de agua bidestilada estéril sobre la superficie del adaptador, colocamos la tapa de factor 50 – Lp 0,2 mm para luego presionar la opción BLANK esto con el objetivo de calibrar y obtener "cero de Absorbancia" (0.000 A°).
- Para absorber el agua se utilizó papel "tissue", inmediatamente se puso 2 μ L de muestra de ADN, colocamos la tapa se apretó la opción SAMPLE para la lectura de los resultados de la cuantificación y pureza del Ácido Desoxirribonucleico, para luego absorber la muestra con papel "tissue".
- Repetimos la cuantificación de las muestra de ADN.

- g) Concluida la cuantificación del ADN, se colocó 2 μL de agua bidestilada estéril, se desecó con papel “tissue” para luego culminar con el apagado del equipo.

3.6.2. Evaluación de la calidad del ADN extraído por electroforesis

La calidad, en términos de integridad del ADN obtenido, fue visualizada en electroforesis, ejecutando los consiguientes pasos:

- a) A partir de la muestra del Ácido desoxirribonucleico, realizamos las preparaciones de los volúmenes de carga para nuestra electroforesis en gel de agarosa al 1% (**Anexo 11**), según la tabla siguiente:

Tabla 2. Elaboración de carga del Ácido desoxirribonucleico para visualización de banda en electroforesis.

Nº de carril en gel de agarosa	ADN stock (μL)	Buffer Loading 6X (μL)	Volumen de agua PCR (μL)	Volumen final de carga (μL)
1	8ul	2ul	2ul	12ul

- b) Se añadió el contenido de las mezclas a todos los pocillos del gel de agarosa al 1%, a sus concernientes carriles.
- c) Para proseguir instalamos la cámara electroforética al fuente de poder y dejando correr a 30 voltios por un periodo de 1 h.
- d) Se sumergió el gel de agarosa en un recipiente conteniendo bromuro de etidio al 1% por 10 minutos, luego se realizó 2 enjuagues con agua de grifo, posteriormente observamos por radiación UV en el sistema de registror de retratos marca Biometra UV solo TS. se captó fotografías con una cámara de 12,1 mega pixeles full HD, sobre el transiluminador UV marca Ultra Lum. En los dos casos para observar las bandas de Ácido desoxirribonucleico a distintas concentraciones.

3.7. Ensayo de degradación *in vitro*

Desarrollamos usando los protocolos descritos por Miranda⁵¹. Con las siguientes fases:

3.7.1. Preparación del stock de ADN genómico

La concentración del ADN genómico obtenido de *Escherichia coli*, se midió a 260 nm utilizando un espectrofotómetro marca Eppendorf Bio Photometer. En seguida preparamos un grupo a concentración de 1 500 ng/ μL en un volumen final de 200 μL , para la investigación de degradación *in vitro*.

3.7.2. Ensayos de degradación *in vitro* del ADN genómico bacteriano frente al extracto hidroalcohólico y zumo de orégano

Se preparó soluciones del extracto hidroalcohólico de orégano a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL para el primer ensayo, utilizando agua bidestilada estéril. Posteriormente se prepararon concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL para el segundo ensayo. (**Anexo 12**). Con el zumo, se prepararon soluciones a diferentes concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 % con agua bidestilada estéril. (**Anexo 13**). Para los ensayos con el extracto hidroalcohólico de orégano, se utilizaron como blanco las soluciones de 100 mg/mL y 500 mg/mL. Para los ensayos con el zumo de orégano, se usó como blanco la solución al 100 %. Como control de ADN se utilizó 14 μ l de ADN. Adicionalmente, se preparó el tubo con 14 μ l de ADN y 6 μ l del extracto y zumo con la mayor concentración y 3 μ l de Proteinasa K.

Para mayor facilidad, las soluciones para la evaluación de degradación *in vitro* de ADN genómico, se acondicionaron del siguiente detalle.

Tabla 3. Disposición de las soluciones para la primer investigación de degradación *in vitro* del ADN genómico de *Escherichia coli* frente a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de orégano.

Componente	Tubo N°								
	1	2	3	4	5	6B	7C	8C/PK	
Stock de ADN (ul)	14	14	14	14	14	-	20	14	
Extracto hidroalcohólico de orégano	Concentración (mg/mL)	5	10	25	50	100	100	-	100
	Volumen (μ L)	6ul	6ul	6ul	6ul	6ul	20	-	6ul
Proteinasa K (μ L)	-	-	-	-	-	-	-	-	2ul
Volumen final (μ L)	20	20	20	20	20	20	20	22ul	

Incubación en baño María a 37 °C x 1h.

Leyenda :

- (B) : Blanco
- (C) : control
- (PK) : Proteinasa k

Tabla 4. Disposición de las soluciones para la segunda investigación de degradación *in vitro* del ADN genómico de *Escherichia coli* frente a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de orégano.

Componente	Tubo N°									
	1	2	3	4	5	6	7B	8C	9C/PK	
Stock de AND (μL)	14	14	14	14	14	14	-	20	14	
Extracto hidroalcohólico de orégano	Concentración (mg/mL)	50	100	200	300	400	500	500	-	500
	Volumen (μL)	6ul	6ul	6ul	6ul	6ul	6ul	20	-	6ul
Proteinasa K (μL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2ul
Volumen final (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	22

Incubación en baño María a 37 °C x1h

Leyenda:

- (C) : control
 (B) : Blanco
 (PK) : Proteinasa k

Tabla 5. Disposición de las soluciones para la primera investigación de degradación *in vitro* de ADN genómico de *Escherichia coli* frente a diferentes concentraciones de zumo de orégano.

Componentes	Tubo N°								
	1	2	3	4	5	6B	7C	8C/PK	
Stock de AND (μL)	14ul	14	14ul	14ul	14	-	20	14ul	
zumo	Concentración (%)	5	10	25	50	100	100	-	100
	Volumen (μL)	6ul	6ul	6ul	6ul	6ul	20	-	6ul
Proteinasa K (μL)	-	-	-	-	-	-	-	-	2ul
Volumen final (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20	22

Incubación en baño María a 37 °C x 1h

Leyenda:

- (C) : control
 (B) : Blanco
 (PK) : Proteinasa k

Se ejecutaron cuatro repeticiones de cada ensayo de degradación *in vitro* de la planta en exposición, tanto con el extracto hidroalcohólico como el zumo.

3.7.3. Electroforesis en gel de agarosa

Se dispuso el gel de agarosa al 1% y se instaló en una cámara de electroforesis. Para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa, se manejó las cantidades explicadas en la siguiente tabla.

Tabla 6. Preparación de mezclas para electroforesis correspondientes al primer ensayo de degradación *in vitro* con extracto hidroalcohólico de orégano.

Componente	Carril N°								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Extracto. Concentrac. (mg/mL)	-	5	10	25	50	100	B	C	C/PK
Hidroalc. Volumen (µL)	-	8µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8µl	8 µl	8 µl
Loading (µL)	2ul	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Marcador molecular 1kb	5ul	-	-	-	-	-	-	-	-
Volumen final (µL)	7ul	10ul	10 µl	10ul	10ul	10ul	10ul	10 µl	10 µl

Después se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se dispuso el corrido a 40 voltios (V) durante 150 min.

Tabla 7. Preparación de mezclas para electroforesis correspondientes al segundo ensayo de degradación *in vitro* con extracto hidroalcohólico de orégano.

Condiciones	Carril N°									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Extracto Concent. (mg/mL)	-	50	100	200	300	400	500	B	C	C/
Hidroalc. Volumen (µL)	-	8	8µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl
Loading (µL)	2µl	2µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2	2 µl	2 µl
Marcador molecular 1kb(µL)	5µl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Volumen total (µL)	7µl	10	10 µl	10	10 µl	10	10µl	10	10 µl	10

Leyenda:

- (C) : control
 (B) : Blanco
 (PK) : Proteinasa k

Al instante se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se dispuso el corrido a 40 voltios (V) durante 150 min.

Tabla 8. Preparación de mezclas para electroforesis para el ensayo de degradación *in vitro* con zumo de orégano.

Condiciones	Carril N°								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
zumo Concentración (%)	-	5	10	25	50	100	B	C	C/PK
Volumen (µL)	-	8ul	8 µl						
Loading (µL)	2 µl	2µl	2 µl						
Marcador molecular 1kb	5 µl								
Volumen total (µL)	7µl	10µl	10 µl						

Leyenda:

- (C) : control
 (B) : Blanco
 (PK) : Proteinasa k

Para luego conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder y programar el corrido a 40 voltios (V) durante un lapso de 150 min. (**Anexo 14 y 15**).

3.7.4. Fotodocumentación

Pasado el periodo de corrido electroforético, se empapó el gel de agarosa con solución de bromuro de etidio al 1% por un periodo de 15 min, se lavó con agua destilada para la visualización de la banda y/o degradación de ADN, se ubicó el gel en radiación de luz UV, dentro del sistema de registro de imágenes Biometra *UVsolo TS*. Posteriormente capturar fotografías con una cámara de 12,1 mega pixeles, sobre el transiluminador UV marca Ultra Lum. En los dos casos fue para visualizar en los carriles del gel, cada una de las franjas de ADN que fueron enfrentadas a desiguales concentraciones del extracto o zumo de la planta, comparando con las bandas del control y los carriles blancos.

3.7.5. Interpretación visual y clasificación de la degradación *in vitro* del ADN en términos de fragmentación frente al extracto o zumo de la planta, plasmado en el registro fotográfico

El nivel de fragmentación del Ácido desoxirribonucleico como consecuencia de la degradación *in vitro* del ADN frente al derivado de la planta medicinal en estudio, fueron visualizados en el registro fotográfico, se llevaron a una escala de valores numéricos, establecidos en la categorización del “ensayo cometa” propuesto por Speit (1995) y Collins (2004), en tesis de Mónica Marisol Larrea Poma⁵⁵.

Tabla 9. Categorización visual de la degradación *in vitro* del ADN, en términos de niveles de su fragmentación (valores numéricos), observados en registro fotográfico.

Clase: Valor numérico	Genotoxicidad
0	Fragmentación de ADN < 5%
1	Fragmentación de ADN entre 5 a 20%
2	Fragmentación de ADN entre 20 a 40%
3	Fragmentación de ADN entre 40 a 95%
4	Fragmentación de ADN >95%

3.8. Tipo de investigación

Experimental⁵⁶. Por reunir los dos requisitos para lograr el control y la eficacia interna: a) grupos de comparación (manipulación de la variable independiente) y b) equivalencia de los grupos.

3.9. Diseño de investigación

Diseño con pos prueba exclusivamente y grupo control, contiene dos grupos: uno recibe el tratamiento experimental y el otro no (grupo control). El manejo de la variable independiente alcanza dos niveles: presencia y ausencia. Al culminar la manipulación a ambos grupos se les dispone una medición sobre la variable dependiente en estudio.

Tabla 10. Diseño de investigación con pos prueba únicamente y grupo de control.

GRUPO	TIEMPO DE INCUBACIÓN	TRATAMIENTO	OBSERVACIÓN
G ₁	1 hora	Control	O1
		blanco	O2
		5mg/mL	O3
		10mg/mL	O4
		25mg/mL	O5
		50mg/mL	O6
		100mg/mL	O7
		200mg/mL	O8
		300mg/mL	O9
		400mg/mL	O10
		500mg/mL	O11
		PK	O12
G ₂	1 hora	Control	O13
		blanco	O14
		5%	O15
		10%	O16
		25%	O17
		50%	O18
100%	O19		

Se efectuaron cuatro recreaciones de cada prueba.

3.10. Estudios de datos estadísticos

La información adquirida fue agrupada y demostrados en tablas, expresados en registro fotográfico y figuras donde se explica mejor los resultados. Los productos que muestran degradación *in vitro* del ADN fueron evaluados por el paquete estadístico SPSS versión 23, manejando la prueba de Kruskal-Wallis para muestra no paramétrica. El valor de $p < 0,05$ considerado como el nivel estadísticamente significativo.

Por ello se plantea la siguiente hipótesis:

H_0 = No presenta efecto genotóxico.

H_i = Presenta efecto genotóxico.

IV. RESULTADOS

Tabla 11. Evaluación fitoquímica para la caracterización de metabolitos secundarios presente en el extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* L. “orégano”. Ayacucho, 2019.

Metabolito secundario	Ensayo	Resultado	Observación
	Mayer	+	Precipitado blanco
Alcaloides	Draguendorf	+	Precipitado anaranjado
	Wagner	+	Precipitado anaranjado
Lactona y/o cumarina	Baljet	+++	Pardo-rojizo
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	++++	Precipitado azul
Flavonoide	Shinoda	++++	Coloración naranja
Saponina	Espuma	-	Espuma
Azúcar reductor	Benedict	+	Precipitado rojo ladrillo
Catequina	Catequinas	++++	Fluorescencia verdeazulada
Aminoácido	Ninhidrina	-	Color violeta
Glicósidos cardenólidos	Kedde	++	Coloración violáceo

Leyenda:

- (-) : Negativo
- (+) : Trazas
- (++) : Poco
- (+++): Regular
- (++++): Abundante

Tabla 12. Evaluación fitoquímica para la caracterización de metabolitos secundarios presente en el zumo de *Origanum vulgare* L. “orégano”. Ayacucho, 2019.

Metabolito secundario	Ensayo	Resultado	Observación
	Mayer	+++	Precipitado blanco
Alcaloides	Draguendorf	+++	Precipitado anaranjado
	Wagner	+	Precipitado anaranjado
Lactona y/o cumarina	Baljet	+	Pardo-rojizo
Fenol y tanino	Cloruro férrico	++++	Precipitado azul
Flavonoide	Shinoda	+++	Coloración naranja
Saponinas	Espuma	+	Espuma
Azúcar reductor	Benedict	-	Precipitado rojo ladrillo
Catequinas	Catequinas	++	Fluorescencia verdeazulada
Aminoácidos	Ninhidrina	-	Color violeta
Glicósidos cardenólidos	kedde	+	Coloración violáceo

Leyenda:

- (-) : Negativo
- (+) : Trazas
- (++) : Poco
- (+++): Regular
- (++++): Abundante

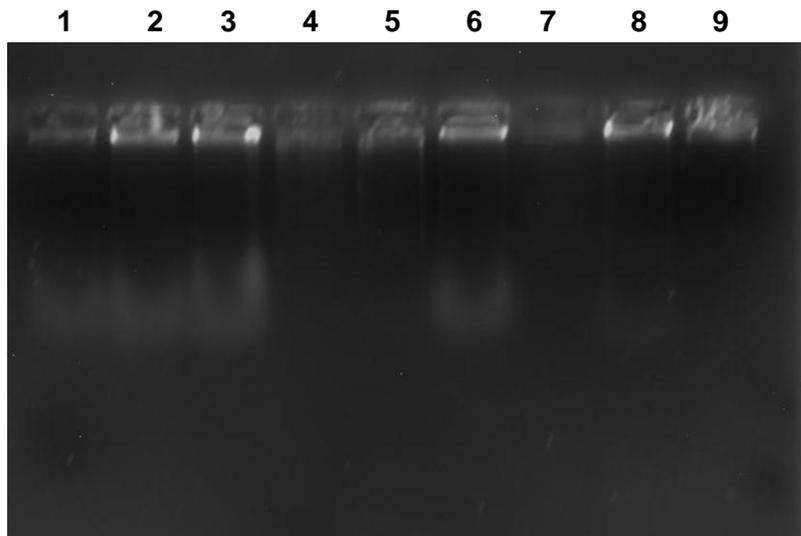


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN genómico de *E. coli*. Corrida a 30V x 60 min. Carriles (1-9).

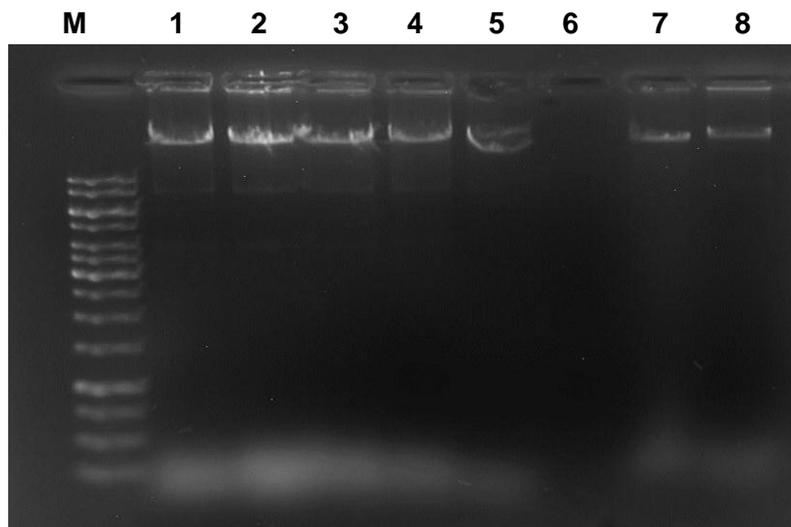


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico de *E. coli* frente al extracto hidroalcohólico de orégano. Corrida a 40V x 150 min. Carril (M), marcador de tamaño molecular de 1 kb; carriles (1-5), extracto hidroalcohólico de orégano a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL, respectivamente; Carril (6), testigo de extracto hidroalcohólico puro de orégano (100 mg/MI); Carril (7), control ADN de *E. coli*. Carril (8), extracto hidroalcohólico puro + Proteinasa K + ADN de *E. coli*.

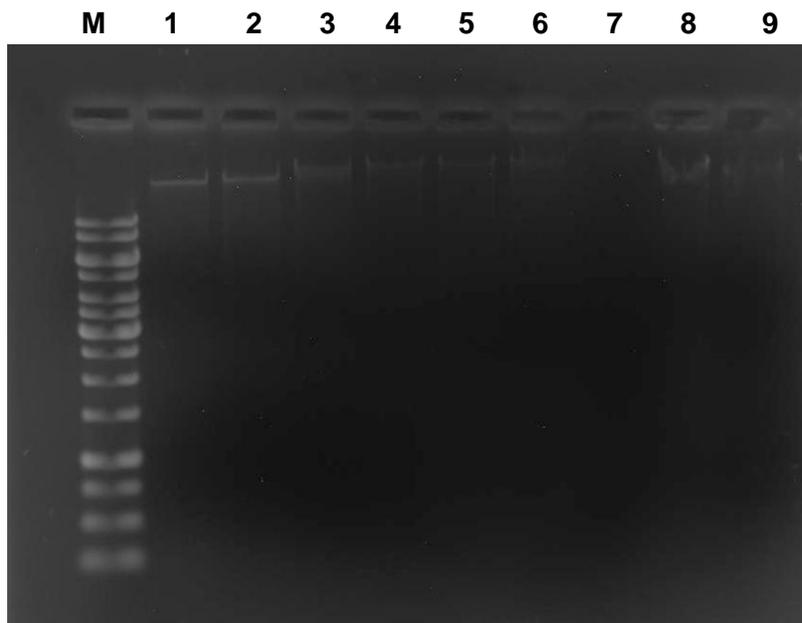


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico de *E. coli* frente al extracto hidroalcohólico de orégano. Corrida a 40V x 150 min. Carril (M), marcador de tamaño molecular de 1 kb; carriles (1-6), extracto hidroalcohólico de orégano a concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, respectivamente; Carril (7), testigo de extracto hidroalcohólico puro de orégano (500 mg/mL); Carril (8), control ADN de *E. coli*; Carril (9), extracto hidroalcohólico puro + Proteinasa K + ADN de *E. coli*.

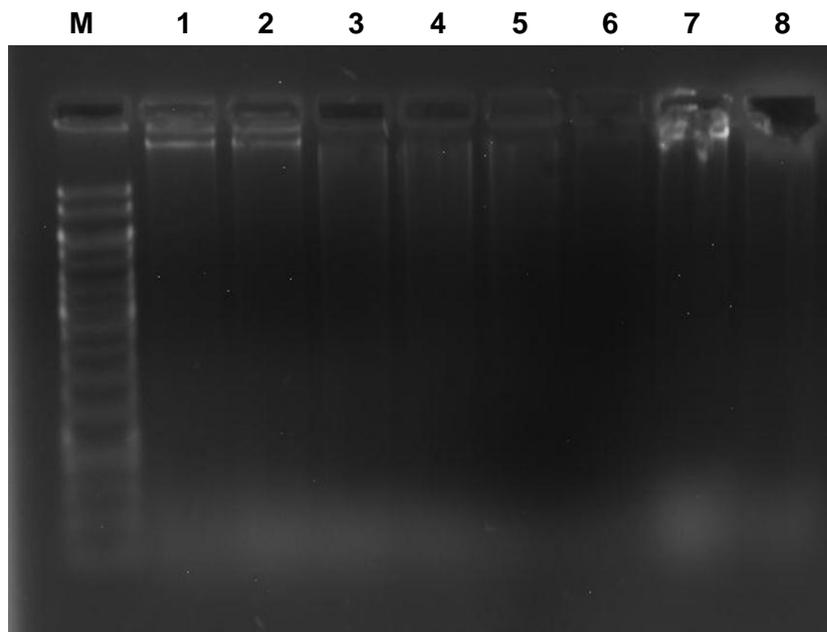


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico de *E. coli* frente al zumo de orégano. Corrida a 40V x 150 min. Carril (M), marcador de tamaño molecular de 1 kb; carriles (1-5), zumo de orégano a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 %, respectivamente; Carril (6), testigo de zumo puro de orégano (100 %); Carril (7), control ADN de *E. coli*; Carril (8), zumo puro + Proteinasa K + ADN de *E. coli*.

Tabla 13. Valores numéricos de cuatro ensayos de degradación *in vitro* del ADN genómico de *Escherichia coli*, expresado en su fragmentación, frente al extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* L. "orégano" a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, incubados a 37°C durante 1h. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.

Condiciones de la incubación		<i>Origanum vulgare</i> "orégano"								
		Extracto hidroalcohólico de hojas y tallos								
		Concentración en mg/mL.								
		5	10	25	50	100	200	300	400	500
Temperatura 37°C	Tiempo	0	0	0	0	1	3	4	4	4
	1h	0	0	0	0	1	3	4	4	4
		0	0	0	0	1	3	4	4	4
		0	0	0	0	1	3	4	4	4

Tabla 14. Valores numéricos de cuatro ensayos de degradación *in vitro* del ADN genómico de *Escherichia coli*, expresado en su fragmentación, frente al zumo de de *Origanum vulgare* L. “orégano” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100%, incubados a 37°C durante una hora. CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.

Condiciones de la incubación		<i>Origanum vulgare</i> “orégano” Zumo de hojas y tallos.				
		Concentración en %				
		5%	10%	25%	50%	100%
Temperatura 37°C	Tiempo	0	0	4	4	4
	1h	0	0	4	4	4
		0	0	4	4	4
		0	0	4	4	4

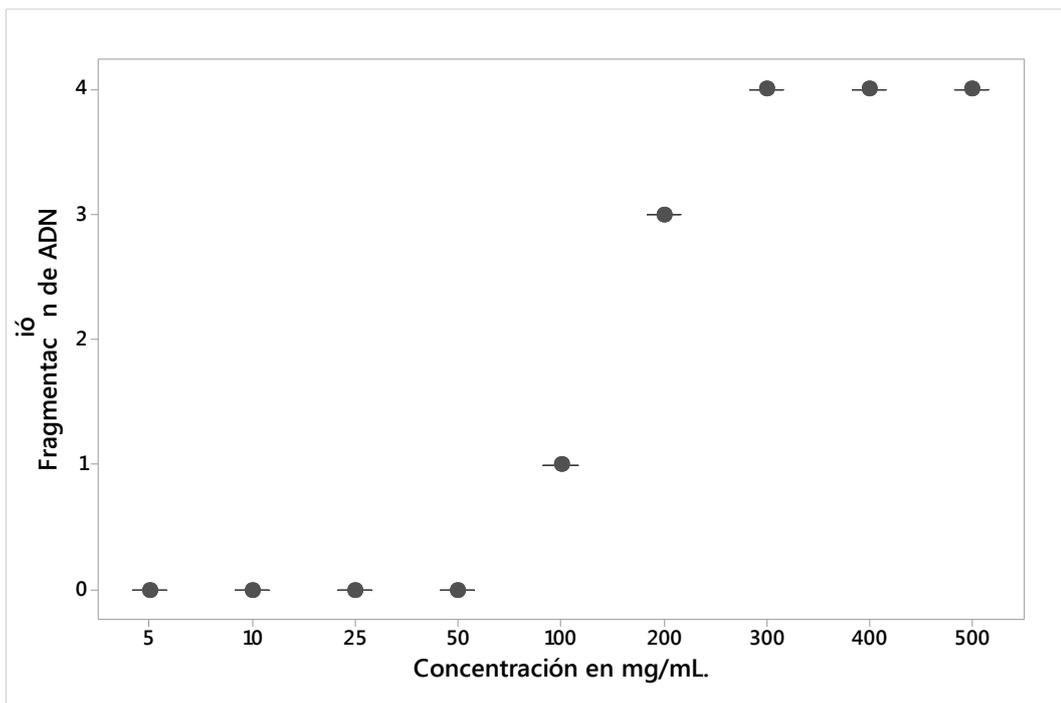


Figura 8. Grado de degradación *in vitro* del ADN genómico de *Escherichia coli* expresado en su fragmentación, frente al extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* L. “orégano” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, incubados a 37°C durante 1h. Prueba de Kruskal-Wallis (H=27,0; GL=6, P=0,000); CIBMB-UNSCH. Ayacucho 2019.

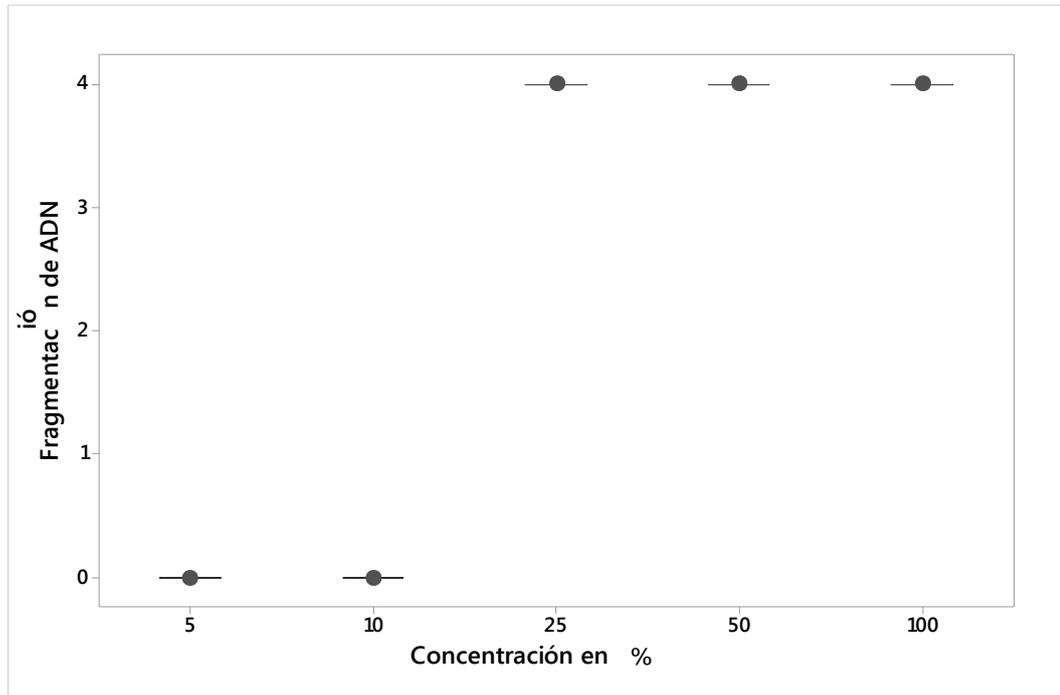


Figura 9. Grado de degradación *in vitro* del ADN genómico de *Escherichia coli*, expresado en su fragmentación, frente al zumo de *Origanum vulgare* L. “orégano” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100 %, incubados a 37°C durante una hora. Prueba de Kruskal-Wallis (H=27,0; GL=6, P=0,000); CIBMB-UNSC. Ayacucho 2019.

V. DISCUSIÓN

La investigación que realizamos nos da una idea para descifrar los resultados, con el objetivo de demostrar la degradación *in vitro* del Ácido desoxirribonucleico de *Escherichia coli*, esto a consecuencia del extracto hidroalcohólico y del zumo de la planta de *Origanum vulgare* L. “orégano”.

La figura 4, corresponde al ensayo realizado con la técnica de separación del ADN denominada electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras de ADN genómico extraído de *Escherichia coli*. Conforme se observa en los carriles 2, 3, 6 y 8 la calidad del ADN es buena, se observa como una sola banda superior sin barrido, es decir, sin indicios de que pudiera haber sufrido una degradación por DNAsas; condición básica necesaria para los posteriores ensayos de degradación frente al extracto hidroalcohólico y zumo de orégano.

La figura 5, muestra la técnica de electroforesis que se realizó en el gel de agarosa a uno por ciento, del ensayo de degradación *in vitro* del ADN genómico de *Escherichia coli* (1500 ng/ μ L) frente al extracto hidroalcohólico de orégano a distintas concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 mg/mL. El ensayo de degradación consistió en la incubación en baño María a temperatura de 37°C por un lapso de 1h. El carril M concierne al marcador de tamaño molecular; mientras que los carriles 1 a 5 pertenecen al tratamiento del ADN de *E. coli* con las concernientes concentraciones del extracto. Se puede estimar que en los carriles 1 a 4 la banda del ADN no han sufrido degradación en concentraciones de 5, 10, 25 y 50 mg/mL, evidenciándose semejante a la banda del ADN *E. coli* a (1,500 ng/ μ L) usando como “control” en el carril 7. El carril 5 muestra una banda de ADN levemente disminuida en relación a la del control, en consecuencia a la degradación que sufrió por el extracto a 100 mg/mL. El carril 6, pertenece al corrido del “blanco” (extracto hidroalcohólico a 100 mg/mL.) El carril 8, pertenece al corrido electroforético del tratamiento al ADN genómico bacteriano con 100

mg/mL de extracto y la enzima Proteinasa K, revelando que la intensidad del color de la banda del ADN ha bajado al igual que la del carril 5, comparando con el “control”; donde se observó que ocurrió degradación del ADN por consecuencia de los compuestos químicos del orégano presentes en el extracto hidroalcohólico descartando la posibilidad de que sea a consecuencia de la actividad de algún tipo de nucleasa precedente del tejido vegetal o del ambiente de trabajo.

En otros trabajos realizados sobre la evaluación genotóxica y citotóxica *in vitro* del extracto antileishmanial preparado a partir de *Julocroton triqueter* contra ADN de leucocitos humanos a cuatro concentraciones diferentes e *in vivo* en ratones suizos a quienes se les suministró el extracto por vía intraperitoneal a concentraciones de 125, 250 y 500 mg/Kg, se observó ausencia de efecto genotóxico tanto *in vitro* como *in vivo*, concluyendo que el extracto hidroalcohólico de *Julocroton triqueter* no provocaron daños en el ADN a concentraciones y dosis normalmente utilizadas para el tratamiento antileishmanial¹⁵.

En la figura 6, se representa los resultados de la electroforesis en gel de agarosa a 1% de los ensayos de degradación *in vitro* del ADN genómico de *Escherichia coli* (1,500 ng/ μ L), frente al extracto hidroalcohólico del orégano a concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL, incubados en baño María a 37°C durante una hora. El carril M corresponde al marcador de tamaño molecular marca NEW ENGLAND BioLabs, 1 Kb Plus DNA Ladder. Los carriles de 1 al 6 son resultados del tratamiento del extracto hidroalcohólico con ADN genómico bacteriano, con las correspondientes concentraciones, se puede estimar que en el carril 1 la banda del ADN no ha sufrido degradación por efecto del extracto a concentración de 50 mg/mL, siempre comparándose con la banda del ADN genómico bacteriano “control” del carril 8, el carril 2 tratado con 100 mg/mL, muestra una banda de ADN genómico bacteriano, ligeramente disminuido comparada con el “control”; mientras que los carriles 3, 4, 5 y 6 ya no muestran bandas de ADN debido a la degradación que ha sufrido por la acción de los componentes del extracto a concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg/mL. El carril 7, corresponde al corrido del extracto hidroalcohólico de orégano (500 mg/mL), donde se observa la ausencia de ADN. La banda que observamos en el carril 8, pertenece al ADN genómico bacteriano sin tratamiento, nos sirve como “control”, para contrastar con el ADN de cada tratamiento a diferentes

concentraciones. El carril 9, concierne al corrido electroforético del tratamiento del ADN genómico bacteriano (1,500 ng/ μ L) , con 500 mg/mL de extracto y la enzima Proteinasa K, revelando que la intensidad del color de la banda del ADN ha bajado al igual que el carril 6, comparando éstas con el “control”; ratificando que la degradación del ADN, es por la acción de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico y no por las enzimas nucleasas que podrían provenir del orégano ya que ellas se encontrarían degradadas por acción de la Proteinasa K, durante la incubación a temperatura de 37°C por 1 h.

Al respecto, un trabajo que resulta comparable en los términos de que a mayor concentración del extracto el efecto sobre el ADN es más dañino, consistió en evaluar la posible actividad genotóxica de alfa-asarona frente a células gaméticas y somáticas de vegetales, para lo cual se prepararon siete concentraciones (30, 60, 90, 150, 180, 210 y 250 μ g/ml) utilizando etanol al 1% como disolvente. Para *Tradescantia* se obtuvo un efecto genotóxico ($p < 0.05$) a concentraciones de 180, 210 y 250 μ g/mL y con el sistema de *Allium cepa* los resultados muestran un efecto genotóxico a la concentración de 210 μ g/mL, sin alteraciones en su índice mitótico (9,0%); mientras que a 250 μ g/ml se observó un efecto citotóxico ($p < 0.05$) con inhibición de la división mitótica (0.12%)¹⁶.

En la figura 7, se presentan los resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% de los ensayos de degradación *in vitro* del ADN genómico de *Escherichia coli* frente al zumo de *Origanum vulgare* L. “orégano” a concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 100 % incubado a 37°C durante 1h. El carril M corresponde al marcador de tamaño molecular; los carriles 1 al 6 corresponden a los ensayos de degradación del ADN genómico bacteriano con el zumo con las concernientes concentraciones, se puede apreciar que en los carriles 1 y 2 el ADN no ha sufrido degradación, siendo similar al carril 7 donde se tiene ADN genómico bacteriano como “control”, es decir que no ha sido tratado con el zumo. Mientras que los carriles 3, 4 y 5 no muestran bandas de ADN debido a la degradación total que ha sufrido el ADN por efecto del zumo a concentraciones de 25, 50 y 100 %, respectivamente. El carril 6, compete al corrido del “blanco”, en otras palabras pertenece, al zumo de orégano a 100 %, donde no se observa la presencia de ADN de origen vegetal. El carril 8, pertenece al corrido electroforético del tratamiento del ADN genómico bacteriano (1,500 ng/ μ L), con 100 % de zumo de orégano más la enzima Proteinasa K, mostrando que la degradación del ADN ha sido total al igual que el carril 5, comparando éstas con

el “control”, lo que confirma que la degradación observada del ADN bacteriano es consecuencia de los compuestos químicos presentes en el zumo de orégano mas no por las enzimas nucleasas que pueden proceder de la muestra del orégano.

Por otro lado, en lo referente a la caracterización cualitativa de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de orégano, en la tabla 11 se puede observar la variación en la proporción de los diferentes metabolitos secundarios presentes, siendo en el orden siguiente: abundante (++++), para fenoles y/o taninos, flavonoide y catequina; regular (+++), para lactonas y/o cumarinas; poco (++) , para glicósidos; muy poco (+), para alcaloides y azúcares reductores; y usencia (-), para saponinas y aminoácidos.

Así mismo, en la tabla 12, se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico del zumo de orégano, donde se observa que la proporción de los metabolitos secundarios presentes es diferente comparada al extracto hidroalcohólico, siendo en el orden siguiente: abundante (++++), para fenoles y/o taninos; regular (+++), para flavonoides y alcaloides; poco (++) , para catequinas; variable (+/-), para alcaloides; y ausencia (-), para aminoácidos y azucares reductores.

Otros autores corroboran la presencia de estos metabolitos secundarios en las plantas medicinales, en el extracto etanólico del ajo, se encontraron fenoles y/o taninos en concentración abundante, en el zumo fenoles y/o taninos y saponinas en concentración abundante, mientras que los cardenólidos se presentaron en escasa concentración²¹. Por otro lado los metabolitos secundarios identificados en el zumo de las flores de Brugmansia arborea L “floripondio” fueron: alcaloides, saponinas, azúcares reductoras y aminos en abundante cantidad; lactonas y/o cumarinas, flavonoides, taninos y fenoles en cantidad moderada; mientras que en el extracto hidroalcohólico de la hojas, se identificaron: flavonoide, alcaloide, , taninos y fenoles, catequinas, amina de manera cuantiosa; azúcares reductores en cantidad moderada²². Así mismo, en retama, se reportó la detección de los siguientes metabolitos secundarios: alcaloides, fenoles y/o taninos, flavonoides, quinonas en cantidad abundante y lactonas y/o cumarinas en regular cantidad; en la tara encontró alcaloides, fenoles y/o taninos, flavonoides, quinonas y lactonas y/o cumarinas en cantidad abundante y en el eucalipto alcaloides, fenoles y/o taninos, flavonoides también abundante, mientras que las quinonas y lactonas y/o cumarinas en regular cantidad²⁴.

Al respecto, existen diferentes trabajos de investigación que han demostrado el efecto dañino o de degradación que ejercen los metabolitos secundarios de

origen vegetal frente al ADN y sus posibles mecanismos de acción. Los flavonoides son metabolitos naturales que cumplen funciones importantes en la medicina tradicional y como aditivos alimentarios. Numerosos flavonoides, incluida la quercetina, se han reportado como inductores de mutaciones en bacterias y aberraciones cromosómicas en mamíferos. Estos efectos al parecer están asociados con la capacidad de los flavonoides para producir radicales hidroxilo, resultando en roturas del ADN. Ensayos de interacción realizados *in vitro*, han demostrado que la quercetina produce daños en el ADN en presencia de iones metálicos. La mezcla de reacción, que contenía ADN monocatenario, diferentes concentraciones de flavonoides e ión cúprico en el tampón, se incubó a tres temperaturas diferentes. A continuación, se evaluó el daño del ADN mediante electroforesis en gel seguida de análisis densitométrico. La mezcla de reacción con quercetina a 4, 20 y 54 °C indujo daño en el ADN de una manera dependiente de la concentración y la temperatura. Estos resultados sugieren que el grupo hidroxilo de la posición 3 del anillo C es necesario para inducir daño al ADN a bajas temperaturas.^{17, 18}.

Estudios químicos *in vitro* señalan que los fenoles también participan en la degradación del ADN. Es ampliamente conocido que la miel, entre sus múltiples propiedades, inhibe el crecimiento bacteriano. Así, en la miel, se ha demostrado que tanto los fenoles como el H₂O₂ participan en la degradación del ADN. El tratamiento del ADN plásmido pUC19 con H₂O₂ solo, no afectó la integridad del ADN; pero la eliminación de H₂O₂ de la miel por la catalasa evitó la degradación del ADN. Los polifenoles extraídos de las mieles degradaron el ADN plasmídico en presencia de H₂O₂ y Cu (II) en una reacción de tipo Fenton. El grado de degradación del ADN se relacionó inversamente con la concentración de polifenoles en este sistema, así como en las mieles. En contenido bajo, los polifenoles de la miel ejercen una actividad pro-oxidante que daña el ADN. Se concluye que la química de acoplamiento entre polifenoles y H₂O₂, que resultó en la autooxidación fenólica y generación de especies radicales fue el mecanismo responsable de degradación del ADN por la miel. Los polifenoles de la miel emergieron como activos intermedios que son necesarios para conferir la acción oxidativa del peróxido de hidrógeno. Estos resultados demuestran un papel fundamental de las actividades antioxidantes/prooxidantes de los polifenoles de la miel en la inhibición del crecimiento bacteriano y la degradación de ADN¹⁹.

Otros estudios han evidenciado que ciertos alcaloides presentes en los extractos vegetales pueden extinguir o bloquear la fluorescencia de los colorantes que se utilizan en la electroforesis de ADN; aspecto que resulta interesante poner en evidencia. Al estudiarse la interacción de los alcaloides estricnina y brucina, presentes en la semilla de *Strychnos nux-vomica* o “nuez vómica”, frente a ADN Tumoral Circulante (CT-DNA), en un sistema que utilizaba el colorante fluorescente rojo neutro (NR), se demostró mediante espectroscopía UV-VIS, espectroscopía de fluorescencia y la curva de temperatura de fusión (T_m), que el alcaloide brucina se intercala competitivamente en la doble hélice del ADN, provocando la extinción de la fluorescencia del sistema ADN-NR⁵⁷.

Esto resulta curioso considerar como una posibilidad en los ensayos de interacción del extracto alcohólico y zumo de orégano frente al ADN de *Escherichia coli*, ya que si bien se ha demostrado la degradación del ADN visualmente en los geles de agarosa por desaparición de la fluorescencia del colorante bromuro de etidio, no se ha demostrado cuantitativamente esta degradación, para lo cual la medición de la concentración de ADN en las mezclas de reacción, antes y después de los ensayos a 37°C por 1 h, suma a los resultados, descartando así la posibilidad de que pudiera estar sucediendo algo similar con algún alcaloide del orégano.

Sobre la base de lo anteriormente expuesto, se puede deducir que en el caso del extracto hidroalcohólico de orégano, por su mayor proporción dentro de los metabolitos secundarios identificados, los fenoles y/o taninos, flavonoides y catequinas, serían los responsables de la degradación del ADN genómico de *E. coli*; mientras que, en el zumo de orégano, bajo este mismo criterio, serían únicamente los fenoles y/o taninos, aunque no necesariamente los más abundantes estarían únicamente implicados.

Estos aspectos que quedan pendientes, deben motivar más investigaciones con nuevos enfoques y más profundos, buscando explicar qué metabolitos específicos están implicados en la degradación del ADN bacteriano y cuál sería su posible mecanismo de acción, utilizando modelos validados tanto de ensayos *in vitro* como *in vivo* ampliamente conocidos por los diferentes grupos de investigación y publicados en la literatura sobre estos temas.

Por otro lado los resultados visualizados en las figuras 5 y 6, tomando como referencia la escala de la tabla 9 de la metodología, fueron llevados a valores numéricos designados al grado de fragmentación del ADN genómico bacteriano, como producto de los ensayos de degradación *in vitro* según la concentración

del extracto hidroalcohólico de orégano, los mismos que se reporta en tabla 13; detalla que con 5, 10, 25 y 50 mg/mL, respectivamente, la degradación del ADN es menor al 5% (valor = 0); con 100 mg/mL, entre el 5 al 20% (valor = 1); con 200 mg/mL, entre 40 al 95% (valor = 3) y con 300, 400 y 500 mg/mL, la degradación es mayor al 95% (valor = 4). Del mismo modo, los resultados de la figura 7, fueron llevados a valores numéricos designados al grado de fragmentación del ADN genómico bacteriano, como producto de los ensayos de degradación *in vitro* según la concentración del zumo de orégano, los mismos que se reporta en tabla 14; detalla que con 5 y 10 % de zumo, la degradación del ADN es menor al 5% (valor = 0); mientras que con 25, 50 y 100 % de zumo, la degradación es mayor al 95% (valor = 4).

Tomando los valores numéricos consignados en la tabla 13, se realizaron los análisis estadísticos con la prueba de Kruskal – Wallis, confrontando el grado de degradación del ADN genómico bacteriano en tratamiento, expresado en porcentaje (%) versus la concentración del extracto hidroalcohólico orégano expresado en (mg/mL), expuesto en la figura 8. El porcentaje de fragmentación del ADN genómico bacteriano revelan el grado de degradación, formulándose, como hipótesis nula (H_0) que todas las medianas son iguales y como hipótesis alterna (H_1) que al menos una mediana es diferente. Los resultados reportan que para $GL=6$ y $H=27,0$ el valor de $P= 0,000$; por tanto, se rechaza la H_0 y se acepta la H_1 , porque P resultó menor que $0,05$. En consecuencia, el grado de degradación del ADN genómico bacteriano tratado, depende de la concentración del extracto hidroalcohólico de orégano. Igualmente, considerando los valores numéricos en la tabla 14, se ejecutaron los análisis estadísticos con la prueba de Kruskal – Wallis, confrontando el grado de degradación del ADN genómico bacteriano en tratamiento, expresado en porcentaje (%) versus la concentración de zumo de orégano expresado en porcentaje (%), mostrado en la figura 9. Formulándose, como hipótesis nula (H_0) que todas las medianas son iguales y como hipótesis alterna (H_1) que al menos una mediana es diferente. Los resultados reportan que para $GL= 6$ y $H= 27,0$ el valor de $P= 0,000$; por tanto, se rechaza la H_0 y se acepta la H_1 , porque P resultó menor que $0,05$. En consecuencia, el grado de degradación del ADN bacteriano tratado, depende de la concentración de zumo de orégano.

Trabajos similares se han desarrollado, aplicando ensayos de degradación *in vitro* de ADN frente a extractos de origen vegetal, tienen resultados comparables

en la medida en que en estos extractos se encuentran metabolitos secundarios que cuyo efecto dañino sobre el ADN es conocida. Así se evaluó preliminarmente la genotoxicidad del extracto etanólico de *Allium sativum* "ajo" frente al ADN de *Staphylococcus*, encontrándose que a concentraciones de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500mg/mL, sin efecto de degradación del ADN; al contrario que con el zumo del bulbo de ajo, a concentraciones de 5, 10, 50 y 100%, presenta un poderoso efecto de degradación del 100% del ADN²¹.

Así mismo, se encontró que el látex fresco de *Carica papaya* L. "papaya", frente al ADN humano a concentraciones de 1%; 2,5%; 5%; 10%; 25%; 50% y 100% degradó completamente al ADN genómico humano; pero a concentraciones de 10%, 25% y 50% de látex cristalizado, la degradación fue parcial; y al 100% de látex cristalizado se degradó en mayor proporción, demostrándose una dependencia directa respecto a la concentración²³. Igualmente, extractos vegetales de flores de *Spartium junceum* L. "retama", vainas de *Caesalpinia spinosa* Kuntze "tara" y hojas de *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto", mostraron tener efectos de degradación sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*²⁴.

VI. CONCLUSIONES

1. El ADN genómico de *Escherichia coli* presenta efecto de degradación *in vitro* frente al extracto hidroalcohólico y el zumo de *Origanum vulgare* L. “orégano”.
2. Los compuestos químicos presentes en el extracto hidroalcohólico de la planta de *Origanum vulgare* L. “orégano” encontramos al fenol y taninos, flavonoides y catequinas en concentraciones abundantes (++++); seguido de lactonas y/o cumarinas en regular concentración (+++); glicósidos/cardenólidos en poca concentración (++) y trazas (+) de alcaloides y azúcares reductores. Mientras que, en el zumo se identificaron fenoles y/o taninos en concentraciones abundantes (++++); seguidos de flavonoide y alcaloide en regular concentración (+++); catequinas en poca concentración (++); y trazas (+) de lactonas y/o cumarinas, saponinas y glicósidos/cardenólidos.
3. El efecto sobre la degradación del ADN genómico de *Escherichia coli* es dependiente de la concentración del extracto hidroalcohólico, donde en concentraciones de 5, 10, 25 y 50 mg/mL, el efecto es bajo; a 100 mg/mL es moderado; y cuando las concentraciones son 200, 300, 400 y 500 mg/mL, es alto. Respecto al zumo, el efecto sobre la degradación del ADN genómico de *Escherichia coli* fue también dependiente de la concentración, ya que al 5 y 10 %, tuvo un efecto bajo; pero a concentraciones de 25, 50 y 100%, el efecto fue alto.

VII. RECOMENDACIONES

1. Implementar ensayos para confirmar la degradación del ADN genómico de *Escherichia coli*, de tal manera que su concentración pueda conocerse antes y después de la reacción de degradación *in vitro*.
2. Ampliar los estudios de las interacciones entre el ADN procariota, eucariota o plasmídico y los metabolitos secundarios de origen vegetal, evaluando el efecto genotóxico con los ensayos *in vitro* y experimentos realizados con organismos vivos conocidos en la literatura.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Harvey AL, Clark RL, Mackay SP, Johnston BF. Current strategies for drug discovery through natural products. *Expert Opin Drug Discov.* 2010; 5(6):559-68.
2. Sharapin Nikolai "fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos" Primera edición Colombia 2000.
3. Muhammad H, Gomes-Carneiro MR, Poa KS, De-Oliveira ACAX, Afzan A, Sulaiman SA, et al. Evaluation of the genotoxicity of *Orthosiphon stamineus* aqueous extract. *J Ethnopharmacol.* 2011; 133(2):647-53.
4. Munari CC, Alves JM, Bastos JK, Tavaresa DC. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. *J Appl Toxicol.* 2010; 30(1):22-8.
5. Regner GG, Gianesini J, Von Borowski RG, Silveira F, Semedo JG, Ferraz A de BF, et al. Toxicological evaluation of *Pterocaulon polystachyum* extract: A medicinal plant with antifungal activity. *Environ Toxicol Pharmacol [Internet].* 2011; 31(1):242-9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2010.11.003>
6. Arcila-Lozano CC, Loarca-Piña G, Lecona-Urbe S, González De Mejía E. El orégano: Propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Arch Latinoam Nutr.* 2004;54(1):100-11.
7. Sponchiado G, Lucia M, Dadalt C, Silva B, Mello-sampayo C De, Almeida D, et al. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *J Ethnopharmacol [Internet].* 2016;178:289-96. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.026>
8. Ananthi R, Chandra N, Santhiya ST, Ramesh A. Genotoxic and antigenotoxic effects of *Hemidesmus indicus* R. Br. root extract in cultured lymphocytes. *J Ethnopharmacol.* 2010; 127(2):558-60.
9. Melo-Reis PR., Bezerra LSA., Vale MAAB., Canhête RFR., Chen-Chen L. Evaluación de la actividad mutagénica y antimutagénica del látex *Synadenium umbellatum* Pax mediante prueba de micronúcleos en ratones. *Brazilian J. Biol* 2011; 71 (1): 169-174.
10. Lázaro DC, López YI, Vázquez AIF, Odio AD, González JE, Sánchez LM, et al. Genotoxic assessments of aqueous extract of *rhizophora mangle* L. (mangle rojo) by spermatozoa head assay. *Rev Cuba Plantas Med.* 2010; 15(1):18-26.
11. García Franco SN. Citotoxicidad y genotoxicidad de dos extractos naturales. 2003; 192.
12. Rodriguez-Garcia I, Silva-Espinoza BA, Ortega-Ramirez LA, Leyva JM, Siddiqui MW, Cruz-Valenzuela MR, et al. Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016; 56 (10) : 1717 - 27. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/loi/bfsn20%0AOregano>
13. Derwich, E., Benziane, Z., Manar, A., Boukir, A. y Taouil, R. Análisis fitoquímico y actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *origanum vulgare*. *Revista estadounidense-euroasiática de investigación científica .* (2010). 5(2)10/6.
14. Carballo, M., Cortada, C. & Gadano, A. Citogenética Humana y Genética Toxicológica. CIGETOX. Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA. Buenos Aires- Argentina. 2005.
15. Moreira VR, Dias ACS, Martins ARP, Lima MIS, Serra ICPB, Ribeiro MNS, et al. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of antileishmanial extract from *Julocroton triqueter* (Euphorbiaceae). *Genet Mol Res.* 2013;12(2):1132-

- 42.
16. Juárez, G.M. Evaluación de la posible actividad genotóxica de alfa-asarona en células gaméticas y somáticas de vegetales. México. 2013. 3010.1002/jat.1467 Journal of applied toxicology.
 17. Elmegeghi S, Su C, Buglewicz DJ, Aizawa Y, Kato TA. Effect of hydroxyl group position in flavonoids on inducing single-stranded DNA damage mediated by cupric ions. *Int J Mol Med*. 2018;42(1):658-64.
 18. Sugihara N, Kaneko A, Furuno K. Oxidation of flavonoids which promote DNA degradation induced by bleomycin-Fe complex. *Biol Pharm Bull*. 2003;26(8):1108-14.
 19. Brudzynski K, Abubaker K, Miotto D. Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: Polyphenol/H₂O₂-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. *Food Chem* [Internet]. 2012;133(2):329-36. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.035>.
 20. Bruges K, Reguero Reza M. Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. *Rev Colomb Biotecnol*. 2007; 9(1):5-13.
 21. Marca P, Miranda T, Moreno M, Galindo Y, Arenas J. preliminary evaluation of the in vitro genotoxicity of the ethanolic extract and *allium sativum* L. "garlic" juice against the dna of *staphylococcus sp*. 5to congress international sober pharmacology de products naturals. Cuba, 2018.
 22. García V, Miranda T, Moreno M, Condor R, Arenas J. in vitro genotoxicity of the flower juice and hydroalcoholic extract of leaves of *Brugmansia arborea* (L) Lager "floripondio" In front the human genomic DNA 5^{to} Congreso internacional sobre Farmacología de productos naturales. Cuba, 2018.
 23. Moreno M, Miranda T, Quispe C, Rivera J, Ango H. Evaluación de la genotoxicidad in vitro de látex fresco y cristalizado de *Carica papaya* L. "papaya" frente a ADN genómico humano. II Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. Durango, México. 2017.
 24. Ayala, E. Efecto genotóxico in vitro de plantas medicinales antibacterianas *Spartium junceum* L. "retama", *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze "tara" y *Eucaliptus globulus* Labill "eucalipto". 2013.
 25. Aucasime L. Herbario Huamangensis. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2013.
 26. asturnatura.com "*Origanum vulgare* L. *Asturnatura.com*. Núm. 116, 29/01/07 Disponible en: <https://www.asturnatura.com/especie/origanum-vulgare.html>. ISSN 1887-50684.
 27. Oniga I, Pus C, Silaghi-Dumitrescu R, Olah NK, Sevastre B, Marica R, et al. *Origanum vulgare* ssp. vulgare: Chemical composition and biological studies. *Molecules*. 2018;23(8).
 28. Tellez Monzón L. Caracterización de los aceites esenciales de seis ecotipos de orégano (*Origanum vulgare* spp.) procedentes del valle de urubamba - Cusco; Perú. 2017;132.
 29. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M. *Escherichia coli* O-genotyping PCR: A comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2015;53(8):2427-32.
 30. Capillas Fabara VOO. Universidad Central de Ecuador. Frec Enterobact Prod beta-lactamasas espectro extendido y Nefrol del Hosp Carlos Andrade Marín 2016;(June).
 31. Rodríguez-Angeles MG. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex*. 2002;44(5):464-

- 75.
32. Nada Al-Jassim, David Mantilla-Calderon, Giantommaso Scarascia, Pei-Ying Hong . Bacteriófagos para sensibilizar a una *Escherichia coli* patógena de Nueva Delhi metalo β -lactamasa positiva a la desinfección solar. *Ciencia y tecnología ambientales* 2018, 52 (24), 14331-14341.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04501L>.
 33. Betancor, M. Gadea KF. *Genética bacteriana*. Vol. 9, *Genética Bacteriana*. 1996. 215-226 p.
 34. Verma SC, Qian Z, Adhya SL. Architecture of the *Escherichia coli* nucleoid. *PLoS Genet*. 2019; 15(12):1-35.
 35. Perna, N., Plunkett, G., Burland, V. et al. Secuencia genómica de *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7. *Nature* 409, 529-533 (2001).
<https://doi.org/10.1038/35054089>
 36. Adriana Salazar Monte, Ana Sandoval Rodríguez JAB. *Fundamentos y Aplicaciones en las ciencias de la salud*. Vol. 53, *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2019. 1689-1699 p.
 37. Checa Rojas, A. *Extracción de ADN*, *Bioquímica y biología molecular* 2018. Conogasi.org Sitio web: <http://conogasi.org/articulos/extraccion-de-adn-2>.
 38. *Innovación científica en Biología Molecular y Celular*. 2015 Cientifica Senna S.A. de C.V. Proteinasa k.
<http://www.cientificasenna.com/index.php?modulo=catalogo&accion=articulo&id=1652>.
 39. Granero CM, Hinojosa CP, Flores GM, Pérez-Madero LN, Guerrero LJ. Protocolo para la evaluación de la calidad del ADN obtenido de muestras biológicas para su uso en diagnóstico e investigación biomédica. *Inst Valencia Oncol* 2018;1.
 40. Andres C, Rosa CG, Banco P. *Controles de calidad*. 2015;33.
 41. Adrien Gallou, Alba P. Suaste Dzul, María G. SD, Michael. *Manual de Practicas del Laboratorio de Biología Molecular*. Primera Edición. 2015. 90 p. México: Unidad de Promoción y Vinculación - Senasica; 2015.
 42. Fierro FF. *Electroforesis de ADN*. *Herramientas Mol Apl en Ecol Asp teóricos y prácticos*. 2014; 27-52. Disponible en:
<https://micrositios.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/electroforesis.pdf>
 43. Sánchez, A., Fonseca, G., Capiro, N. & Fernández, D. (2000). Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. *Revista Cubana de Farmacia*, 34, 34-43.
 44. Domingo D, López M, *Plantas con acción antimicrobiana*. 2014; (May). *Revista Española de Quimioterapia*, ISSN 0214-3429, Vol. 16, Nº. 4, 2003, pags. 385-393.
 45. Gómez, et. al. Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomun zeylanicum*). *Temas Sel Ing Aliment* 3. 2009; 1:33-45.
 46. Repetto Jiménez M, Repetto Kuhn G. *Toxicología Fundamental*. Cuarta Edición. 2009. 620 p. Madrid: Díaz de Santos; 2009.
 47. Diaz Rubio E. *Glosario del cáncer*. 2015; Disponible en:
<https://www.aecc.es/sites/default/files/migration/actualidad/publicaciones/documentos/glosario.pdf>
 48. *Glosario de términos Toxicológicos*. La revista de toxicología, órgano de expresión científica de la Asociación Española de Toxicología. 2013, <http://revista.aetox.es>.
 49. Herrero Felipe O, *Evaluación de Mutagenicidad y Genotoxicidad*. Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Madrid; 22-25 de marzo de 2004.
 50. Aiassa D, Mañas F, Bosch B, Peralta L, Gentile N, Bernardi N, et al.

Biomarcadores de daño genético en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas. ISSN electrónico 1900-1649. Volumen 17, Número 3, p. 485-510, Exp Méd. 2012; 28(1):39-44.

51. Miranda T. "Método Tomasevich": para determinar el Efecto Genotóxico *in vitro* de plantas medicinales y/o productos fitoterapéuticos. 2do Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. Clave: TXG808. Durango: México. 2017.
52. Sánchez H, Reyes C. Metodología y diseños en la investigación científica 2ª ed. Lima Editorial Mantaro 1996.
53. Lock de Ugaz, O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2º ed. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
54. Sambrook J, Russel D. Molecular cloning: A laboratory manual. 3 edition, NY, USA: Cold. Springer Harbor; 2001.
55. Larrea Poma M, Tirado Bustillos N, Eugenia Ascarrunz MG. Daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del Municipio de Luribay, 2010; 18(2):31-43.
56. Sampieri, R.; Fernández Collado, C.; Baptista Lucio, M. (2010). "Metodología de la Investigación", Quinta edición. McGraw Hill: México. (Capítulo 7) 58.
57. Liu F, Wang X, Han X, Tan X, Kang W. Cytotoxicity and DNA interaction of brucine and strychnine-two alkaloids of semen strychni. Int J Biol Macromol [Internet]. 2015;77:92-8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.017>.

ANEXOS

Anexo 1. Constancia de identificación botánica de *Origanum vulgare* "orégano".
Ayacucho 2018.

CONSTANCIA

LA BIÓLOGA LAURA AUCASIME MEDINA ESPECIALISTA EN TAXONOMÍA Y SISTEMÁTICA DE PLANTAS DEJA CONSTANCIA:

Que, la Bachiller en Biología. **Srta. Judith, LAGOS HUACHACA**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988. Siendo su taxonomía el siguiente:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	LAMIALES
FAMILIA	:	LAMIACEAE
GENERO	:	<i>Origanum</i>
ESPECIE	:	<i>Origanum vulgare</i> L.
N. V..	:	" orégano "

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 20 de Noviembre del 2018



LAURA AUCASIME MEDINA
BIÓLOGA
Reg. C.B.P. N° 583 C.R. - XIII

Anexo 2. Acta de entrega de la Cepa de *Escherichia coli*. Ayacucho 2019.



"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

ACTA DE ENTREGA

Por el presente se deja constancia, que en apoyo al desarrollo de la Tesis de pre grado de título: **"Efecto genotóxico in vitro del extracto hidroalcohólico y zumo de *Origanum vulgare* L. "Orégano" frente a ADN de *Escherichia coli*. Ayacucho 2019;** que se realizará en la Facultad de Biología por la **Bach. LAGOS HUACHACA, Judith;** de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, a su solicitud de la interesada. Se le otorga:

CEPA REPICADA: *Escherichia coli* ATCC 25922

FECHA DE REPIQUE: 11/03/2019

ÁREA CORRESPONDIENTE: Enteropatógenos

RESPONSABLE: Blga. Miriam Meneses Meneses

FINES: Solo para el uso en investigación.

RESPONSABILIDADES: El Laboratorio Regional de Salud Pública DIRESA Ayacucho, no se responsabiliza de otros usos que se le dé al material biológico. Siendo de entera responsabilidad de la solicitante.

Se otorga el presente, para uso sólo de la tesis de investigación ya mencionada.

Ayacucho, 15 de marzo del 2019

Atentamente,

GOBIERNO REGIONAL DE AYACUCHO
DIRECCION REGIONAL DE SALUD AYACUCHO
DIRECCION DE LABORATORIO REGIONAL REFERENCIAL

Blga. Froylán Malmaceda
DIRECTOR

DIRECCION REGIONAL DE SALUD AYACUCHO
LABORATORIO REGIONAL DE SALUD PUBLICA
Jr. Las Palmeras s/n (Frente al I.E. Primaria "Mariscal Cáceres")- Telf. (066)-634406
Huamanga - Ayacucho

Anexo 3. Parcela y secado a temperatura ambiente de las hojas y tallos de *Origanum vulgare* L “orégano”. Ayacucho, 2019.



Parcela de orégano



Secado del orégano



Anexo 4. Obtención de molienda y extracto hidroalcohólico de las hojas y tallos secos de *Origanum vulgare* L “orégano”. Ayacucho, 2019.



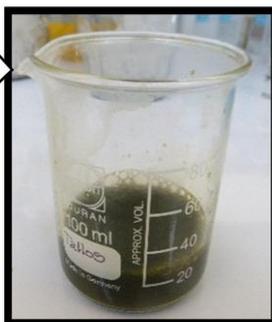
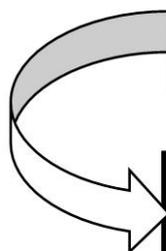
Anexo 5. Obtención del zumo del *Origanum vulgare* L. “orégano”. Ayacucho 2019.



Muestra de orégano

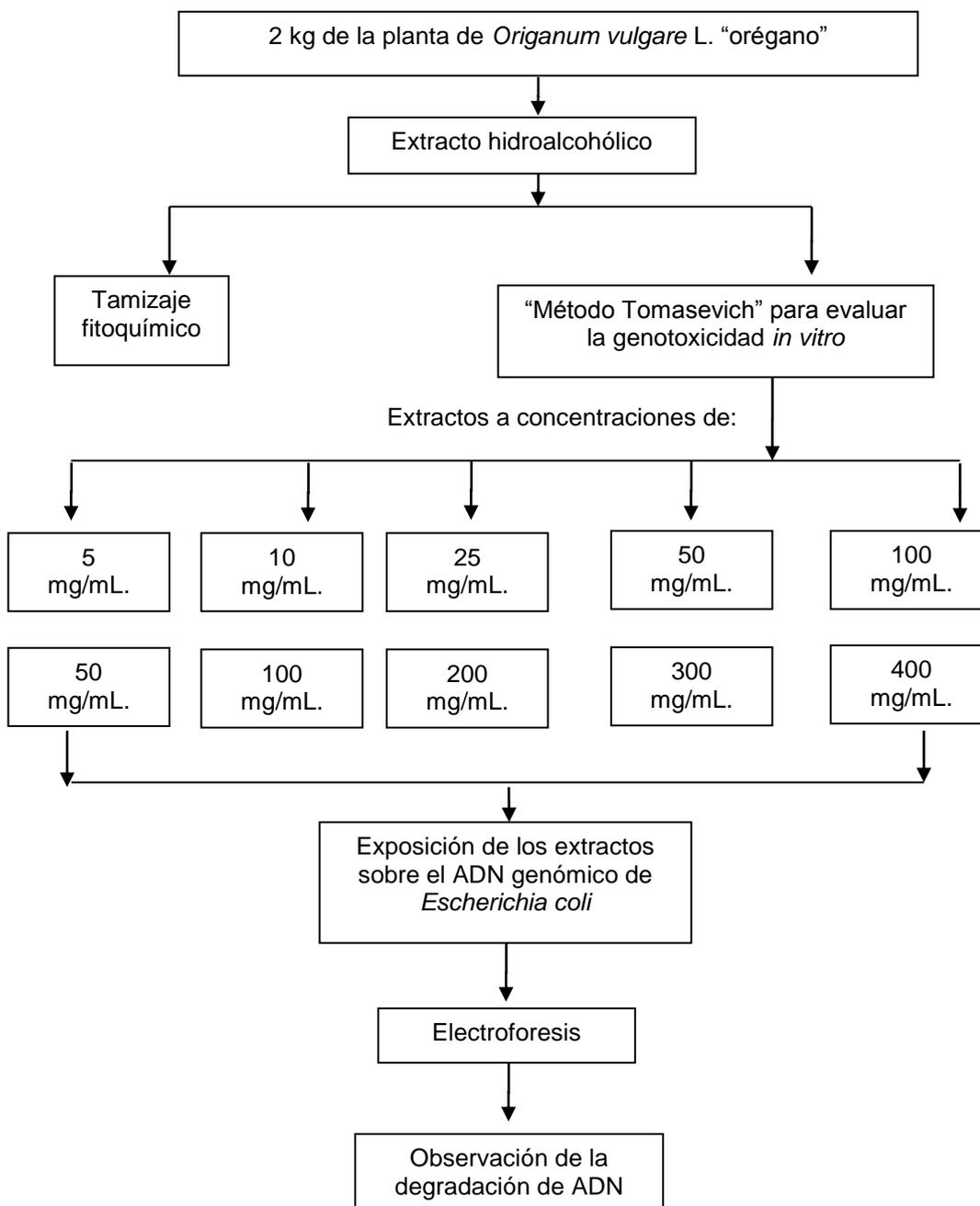


Molienda de la muestra

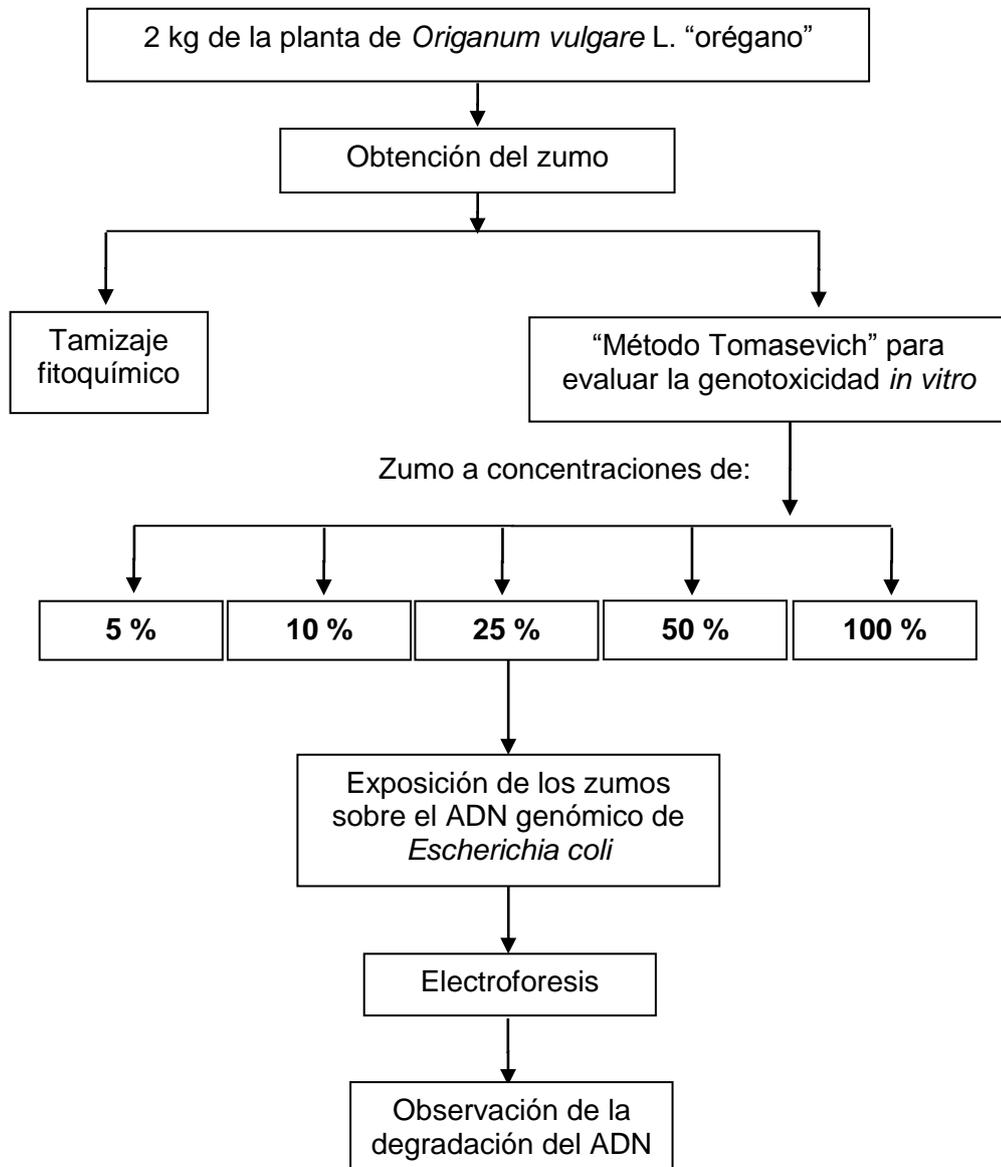


Obtención del zumo de “orégano”

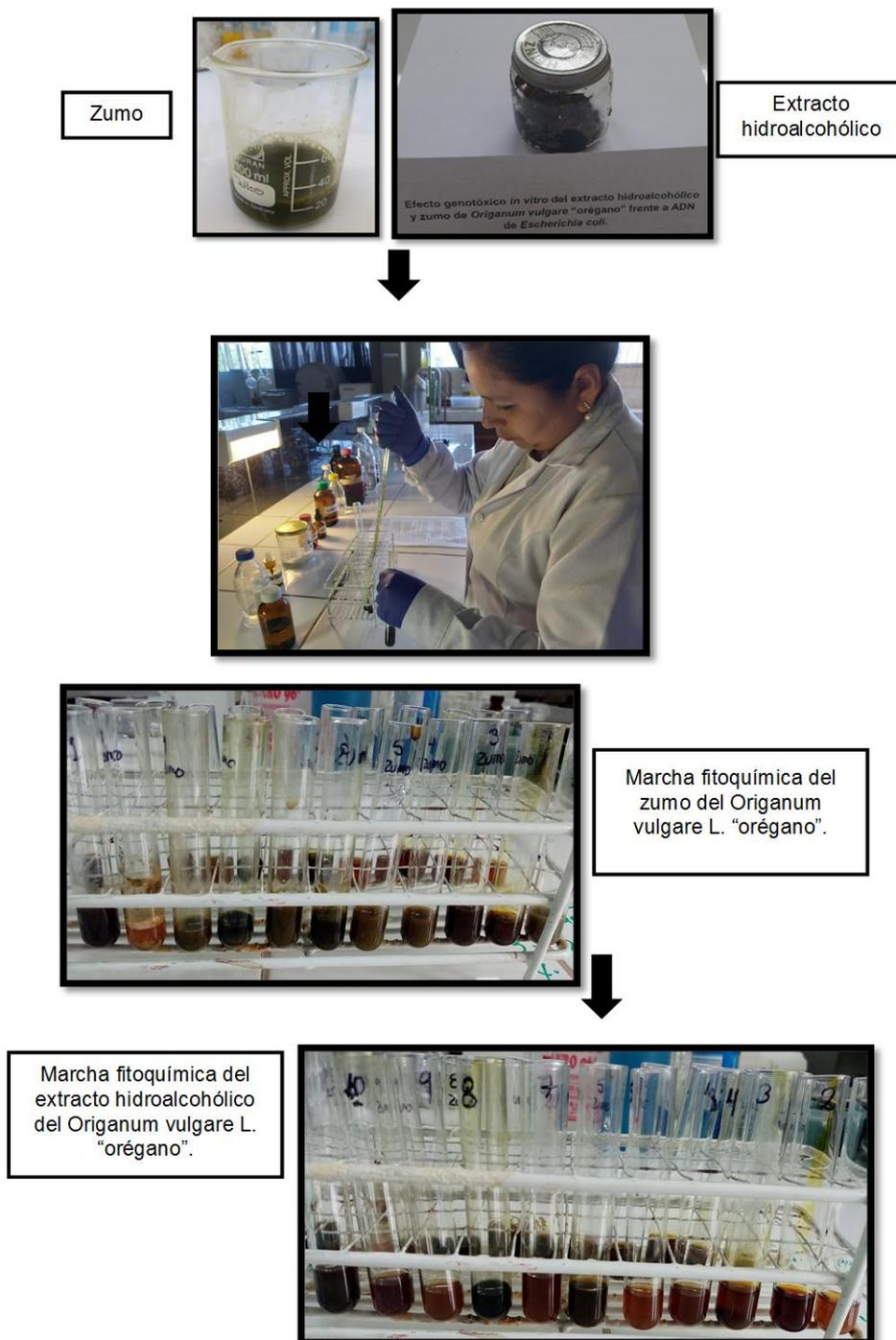
Anexo 6. Flujograma para la obtención del extracto hidroalcohólico del *Origanum vulgare* L. “orégano”. Ayacucho 2019.



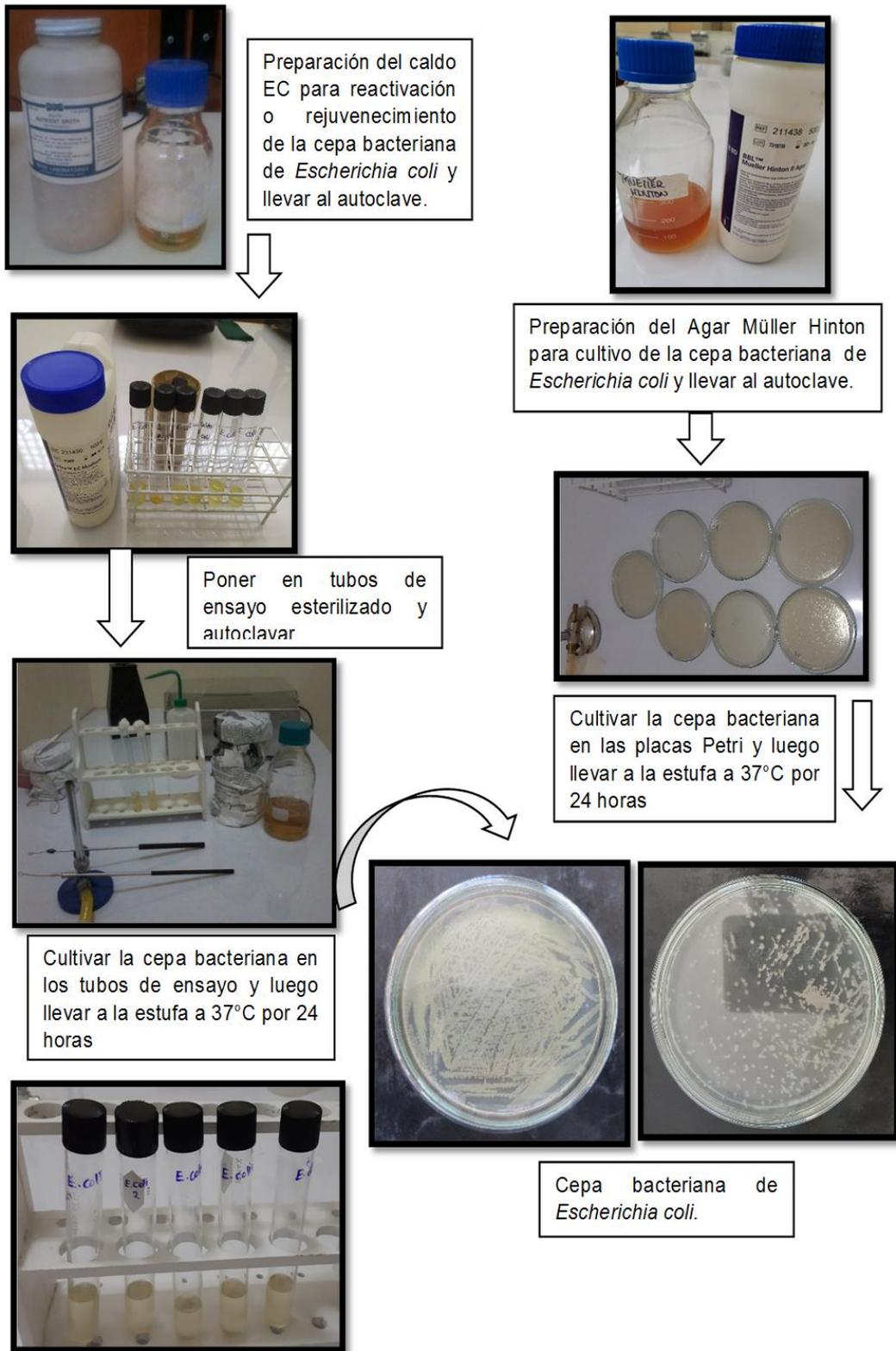
Anexo 7. Flujograma para la obtención del zumo de *Origanum vulgare* L. “orégano”. Ayacucho 2019.



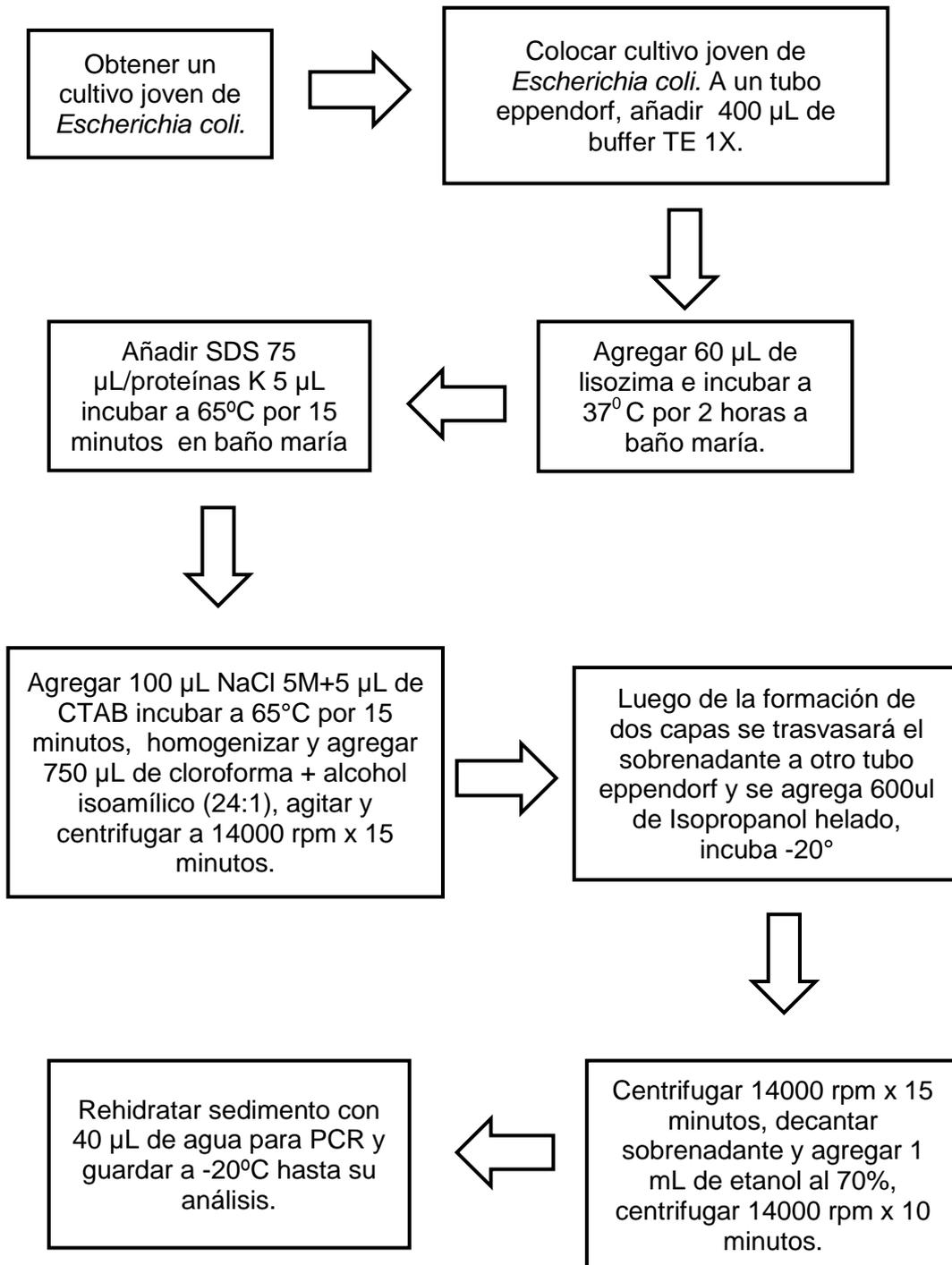
Anexo 8. Diagrama para la identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico y del zumo de “orégano”. Ayacucho 2019.



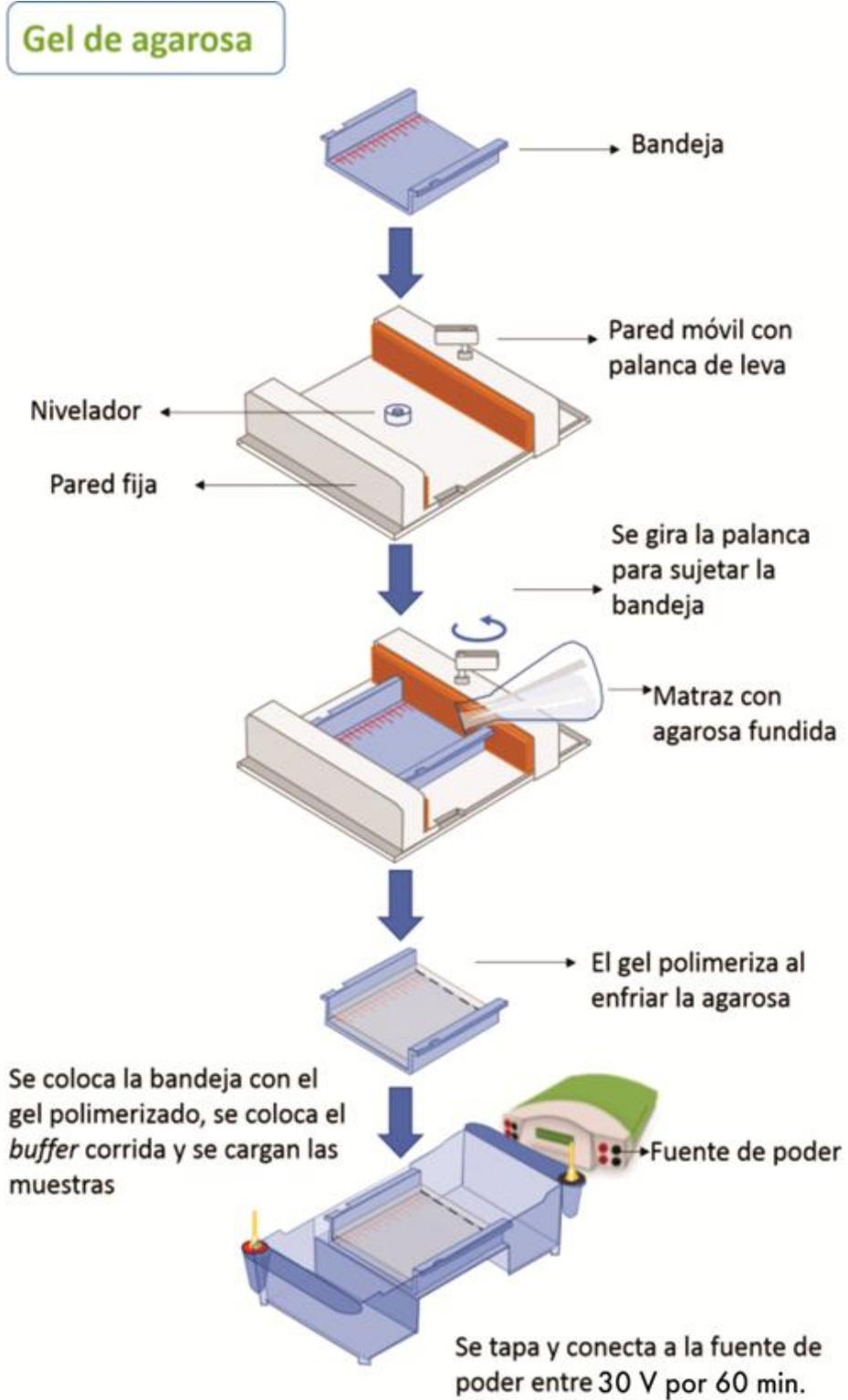
Anexo 9. Proceso de cultivo de *Escherichia coli*. Ayacucho 2019.



Anexo 10. Proceso de extracción de ADN genómico de *Escherichia coli* Ayacucho 2019.



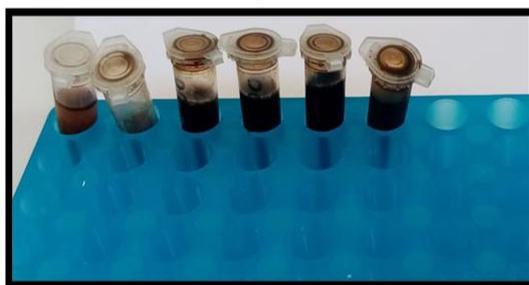
Anexo 11. Proceso de electroforesis del ADN de *Escherichia coli*. Ayacucho 2019.



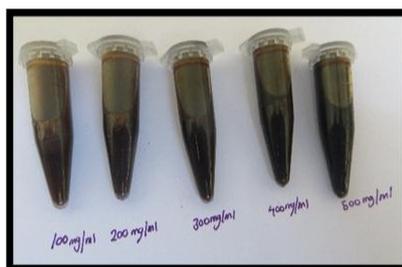
Anexo 12. Proceso de preparación a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de “orégano”. Ayacucho 2019.



Pesado del extracto hidroalcohólico en un tubo eppendorf



Proceso de dilución con H₂O (d)

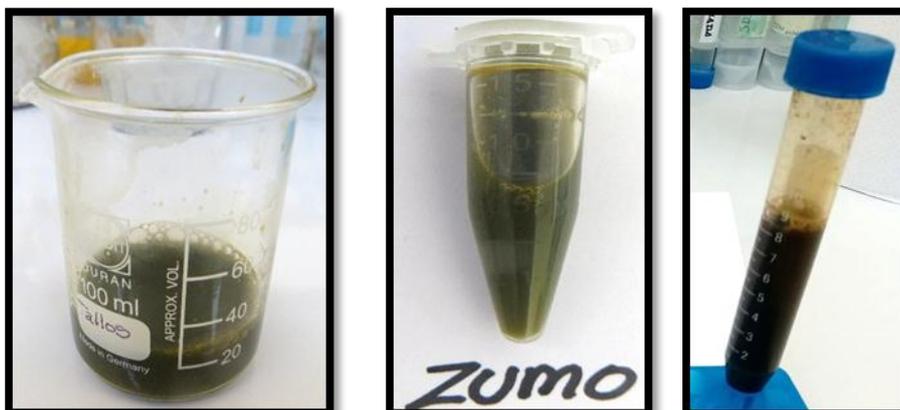


Concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* L. “orégano”.

Anexo 13. Proceso de preparación a diferentes concentraciones del zumo de *Origanum vulgare* L. "orégano". Ayacucho 2019.



Triturar el *Origanum vulgare* L. "orégano" fresco



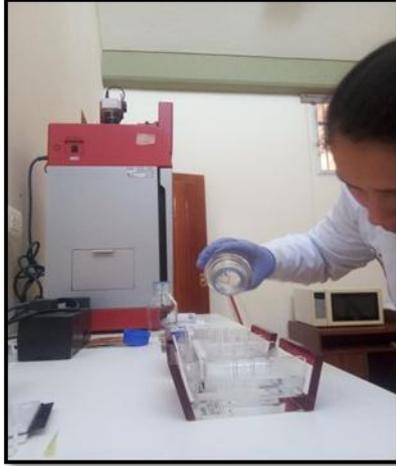
Se filtró con gasa estéril para obtener el zumo del "orégano" fresco.



Preparación a diferentes concentraciones del zumo del *Origanum vulgare* L.

Anexo 14. Electroforesis en gel de agarosa .Ayacucho 2019.

1



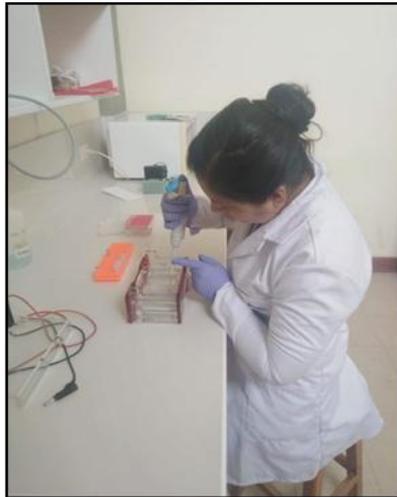
Preparación del gel de agarosa 1%

2



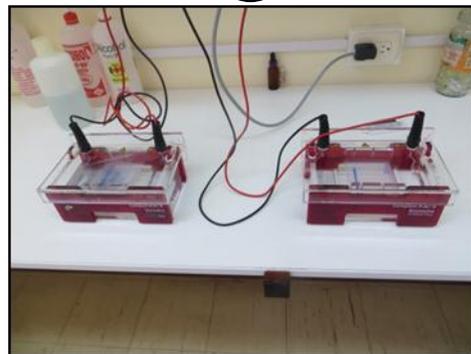
Mezcla de las soluciones de digestión con loading.

3



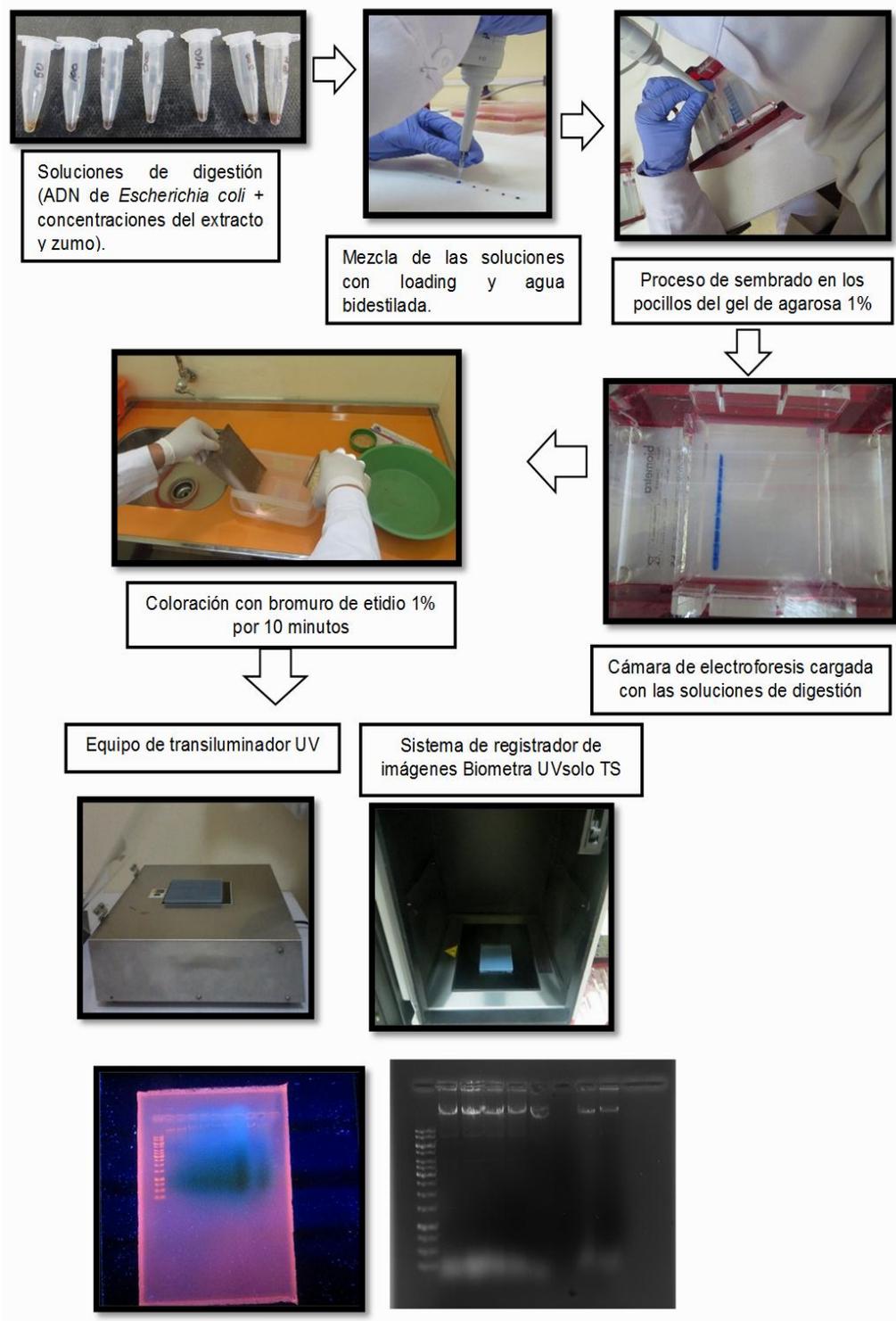
Proceso de sembrado en los pocillos de gel de agarosa

4



Instalación y programación de la cámara de electroforesis.

Anexo 15. Proceso de sembrado en los pocillos del gel de agarosa de la digestión con extracto hidroalcohólico y zumo de orégano y ADN genómico de *Escherichia coli*. Ayacucho 2019.



Anexo 16. Matriz de consistencia.

Título: Ensayo de degradación *in vitro* con extracto hidroalcohólico y zumo de *Origanum vulgare* L. “orégano” frente a ADN de *Escherichia coli*.
Ayacucho 2019. Bach. Judith LAGOS HUACHACA

TÍTULO	PROBLEMA	HIPÓTESIS	MARCO TEÓRICO	VARIABLES	METODOLOGÍA
Ensayo de degradación <i>in vitro</i> con extracto hidroalcohólico y zumo de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” frente a ADN de <i>Escherichia coli</i> . Ayacucho 2019.	¿Tendrá efecto de degradación el extracto hidroalcohólico y zumo de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” en un ensayo preliminar <i>in vitro</i> frente a ADN de <i>Escherichia coli</i> ?	El extracto hidroalcohólico y zumo de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” presenta efecto de degradación en un ensayo preliminar <i>in vitro</i> frente a ADN de <i>Escherichia coli</i>	Aspectos Botánicos <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” Genotoxicidad Las pruebas de genotoxicidad pueden definir como pruebas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , diseñadas para detectar compuestos que induzcan daño genético, directa o indirectamente, por diversos mecanismos.	Variable Independiente: Extracto hidroalcohólico y zumo de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” Indicador: Metabolitos secundarios Concentración miligramos por mililitro (mg/ ml) del extracto hidroalcohólico y zumo. Variables Dependientes: Efecto de degradación frente a ADN de <i>Escherichia coli</i> . Indicador: Grado de degradación del Ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico de <i>Escherichia coli</i> .	Tipo de investigación : Básica – experimental. Diseño Experimental: El experimento se realizará bajo la guía del modelo <i>in vitro</i> para estudiar la actividad de degradación. Población: <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano” que crece en el Valle de Muyurina del distrito de Tambillo la provincia de Huamanga. Muestra: Hojas y tallos de <i>Origanum vulgare</i> L. “orégano”, en cantidad de dos Kg, obtenidos en Muyurina. Unidad experimental: ADN genómico de <i>Escherichia coli</i> . A concentración de 1500 ng/ µL por cada ensayo. Análisis estadístico: paquete estadístico SPSS, Pruebas de Kruskal-Wallis